

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. U. Lösch

**Zur weiteren Charakterisierung der Allergie vom verzögerten
Typ bei dysgammaglobulinämischen B 12-Hühnern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Monika Schindele

aus
Kronach

München 1980

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. U. Lösch

**Zur weiteren Charakterisierung der Allergie vom verzögerten
Typ bei dysgammaglobulinämischen B 12-Hühnern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Monika Schindele

aus
Kronach

München 1980

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 25. Juli 1980



A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
B-Zelle	Von Bursa Fabricii abgeleitete Zelle
C	Komplement
CFA	Complete Freund's Adjuvans
CY	Cyclophosphamid
DTH	Delayed Type Hypersensitivity (Allergie vom verzögerten Typ)
Fc	Kristallisierbares (crystallizable) Fragment des Immunglobulinmoleküls
GT	Gereinigtes Tuberkulin
HDZ	Hautdickenzunahme
i. c.	Intrakutan
IE	Immunelektrophorese
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IgT	T-zellspezifischer Rezeptor
i. m.	Intramuskulär
i. v.	Intravenös
KG	Körpergewicht
M	Molar
MIF	Migrationsinhibitionsfaktor
n	Anzahl
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PPD	Purified Protein Derivate

II

SRF	Skin-reactive factor
TP	Testosteronpropionat
TRF	T-cell replacing factor
TSF	T-cell suppressing Factor
T-Zelle	Vom Thymus abgeleitete Zelle
-	
x	Statistischer Mittelwert

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1. Einleitung und Literatur
 - 1.1. Einleitung
 - 1.2. Literatur

2. Einfluß von verabreichtem Serum und von appliziertem IgG auf die DTH
 - 2.1. Material und Methoden
 - 2.1.1. Tiermaterial
 - 2.1.2. Antigene
 - 2.1.3. Sensibilisierung
 - 2.1.4. Hauttest
 - 2.1.5. Applikation von Serumprotein
 - 2.1.6. Applikation von IgG
 - 2.2. Ergebnisse

3. Einfluß von Leukozytenprodukten auf die DTH
 - 3.1. Material und Methoden
 - 3.1.1. Tiermaterial
 - 3.1.2. Leukozytenisolierung aus peripherem Blut (PBL) von dysgammaglobulinämischen bzw. normogammaglobulinämischen B12 - Tieren und Inkubation der Zellen zur Bildung eines skin-reactive factors (SRF)
 - 3.1.3. Transfer des SRF von dys- bzw. normogammaglobulinämischen Hühnern auf Kontrolltiere
 - 3.2. Ergebnisse

- 4. Transfer "DTH-regulierender Aktivität" sensibilisierter normogammaglobulinämischer B12 - Hühner in sensibilisierte kompatible dysgammaglobulinämische Hühner mit persistierender DTH-Reaktion
 - 4.1. Material und Methoden
 - 4.1.1. Tiermaterial
 - 4.1.2. Gewinnung der Leukozytenkulturen
 - 4.1.3. Durchführung der Untersuchungen
 - 4.1.3.1. Übertragung der Leukozyten von dysgammaglobulinämischen auf dysgammaglobulinämische Hühner bzw. von normogammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische Hühner
 - 4.1.3.2. Übertragung der Leukozyten von dysgammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische Hühner bzw. von normogammaglobulinämischen auf dysgammaglobulinämische Hühner
 - 4.2. Ergebnisse
- 5. Effekt der Tuberkulinisierung auf sensibilisierte, chemisch "bursektomierte" Hühner
 - 5.1. Material und Methoden
 - 5.1.1. Tiermaterial
 - 5.1.2. Chemische "Bursektomie"
 - 5.1.3. Immunelektrophorese (IE)
 - 5.1.4. Statistische Methode
 - 5.2. Ergebnisse

6. Diskussion

6.1. Einfluß von Serum sensibilisierter Kontrollhühner auf die DTH dysgammaglobulinämischer Hühner

6.1.1. Besprechung der Methoden

6.1.2. Besprechung der Ergebnisse

6.2. Einfluß des skin-reactive factors auf die DTH

6.2.1. Besprechung der Methoden

6.2.2. Besprechung der Ergebnisse

6.3. Die wechselseitige Übertragung von Leukozyten normo- gammaglobulinämischer auf dysgammaglobulinämische und von dysgammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische Hühner

6.3.1. Besprechung der Methode

6.3.2. Besprechung der Ergebnisse

6.4. Effekt der Tuberkulinisierung auf sensibilisierte, chemisch "bursektomierte" Hühner

6.4.1. Besprechung der Methode

6.4.2. Besprechung der Ergebnisse

7. Zusammenfassung

8. Summary

9. Literaturverzeichnis



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548319_0054

1. Einleitung und Literatur

1.1. Einleitung

Die seit 1965 im Hause gezüchteten dysgammaglobulinämischen Hühner, die eine verminderte IgG-Serumkonzentration, bei erhöhter IgM- und IgA-Produktion aufweisen (Lösch, 1972; Lösch, Klumpner, Kühlmann-Rabens, Fiedler, im Druck), zeigen trotz des Defektes des humoralen Immunsystems unauffällige bzw. verstärkte zellvermittelte Immunreaktionen. Bei einer Verlaufsuntersuchung der Allergie vom verzögerten Typ (Delayed type hypersensitivity, DTH) bei dysgammaglobulinämischen Tieren ergaben sich signifikant unterschiedliche Reaktionen im Vergleich zu Kontrollhühnern (Scheu, 1978): Die anfänglich hochgradige Hautdickenzunahme verminderte sich bei den Kontrolltieren früher als bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern. 35 Tage nach Sensibilisierung bestand eine signifikante Differenz, die auch noch nach weiteren 35 Tagen erfaßt werden konnte.

Das bedeutet, daß nach anfänglich gleicher Ausbildung der DTH bei beiden Versuchsgruppen es bei den Kontrolltieren nach einer bestimmten Zeit zu einer Gegenregulation kommt, die die DTH aufhebt. Die dysgammaglobulinämischen Tiere sind offensichtlich unfähig, diese Gegenregulation durchzuführen. Die Ursachen für diesen Funktionsmangel sollten in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

Im Hinblick darauf ergibt sich folgende Fragestellung:

1. Liegen im Serum von immunologisch intakten Kontrollhühnern gegenregulierend wirkende Faktoren bezüglich der DTH vor, die den dysgammaglobulinämischen Hühnern fehlen?

Ist dieser Faktor möglicherweise in der Serum-IgG-Fraktion enthalten?

2. Handelt es sich bei der Immundefizienz der dysgammaglobulinämischen Tiere um einen Defekt von Suppressorzellen bzw. um eine fehlende supprimierende Leukozyteninteraktion?

3. Produzieren aktivierte Lymphozyten dysgammaglobulinämischer Hühner in erhöhtem Ausmaß eine Effektorsubstanz der zellvermittelten Immunität, den skin-reactive factor (SRF)?

Resultiert bezüglich der Qualität und Quantität des SRF nach intrakutaner Applikation in den Kehllappen nicht sensibilisierter Kontrolltiere zwischen den sensibilisierten dysgammaglobulinämischen und den normogammaglobulinämischen Spendertieren in Abhängigkeit von der Zeit nach Sensibilisierung eine signifikante Differenz hinsichtlich der Hautdickenzunahme (HDZ)?

Außerdem wurden im Vergleich zu vorliegenden Daten über die DTH dysgammaglobulinämischer Hühner (Scheu, 1978) Grad und Umfang der diesbezüglichen Reaktion bei experimentell immun-supprimierten Tieren festgestellt.

1.2. Literatur

Charakterisierung der Allergie vom verzögerten Typ am Beispiel der Tuberkulinreaktion

Jenner (1798) berichtete zum ersten Mal über die Reaktion vom verzögerten Typ. Durch Koch (1891) wurde der Begriff Tuberkulinreaktion geprägt. Zur Diagnose der Tuberkulose bei Mensch und Rind wurde die Intrakutanprobe durchgeführt. Das histologische Muster der Tuberkulinreaktion zeichnet sich durch eine Anhäufung von mononukleären Zellen, insbesondere von Lymphozyten und Makrophagen aus, der eine perivaskuläre Infiltration von polymorphkernigen Leukozyten vorausgeht. Bei der Allergie vom Soforttyp hingegen steht bzgl. der Hautanschwellung die Ödemflüssigkeit mit nur geringgradiger Zellbeteiligung im Vordergrund (Frei, 1972).

Charakterisierung des kooperativen Zusammenspiels des B-T-Zellimmunsystems

Das Immunsystem des Vogels weist eine morphologische und funktionelle Dissoziation des T- und B-Zellsystems (Thymus und Bursa Fabricii) auf (Warner et al., 1967; Glick et al., 1956; Miller et al., 1961). Thymus- und Bursazellsystem können jedoch nicht für sich gesondert, sondern nur im Kontext besprochen werden. Dem komplexen Zusammenspiel zwischen B-T-Zellen und Makrophagen muß besondere Beachtung geschenkt werden. Clamann et al. (1969) und Miller und Mitchell (1969) erkannten diese Zellkooperation erstmals. Humorale

Faktoren sind in diesen kooperativen Prozeß mit einzubeziehen. Einige Zellcharakteristika, die für die Zellkooperation von großer Bedeutung sind, sollen anschließend aufgeführt werden:

1. T-Zellen sind Thymus-geprägt, bilden keine Ak im klassischen Sinn, besitzen jedoch Ag-erkennende Rezeptoren an ihrer Oberfläche und im aktivierten Zustand Fc-Rezeptoren für cytophile Ak. Außerdem tragen sie T-zellspezifische Determinanten (E-Rezeptoren und T-Antigen) und einen Rezeptor für Makrophagen und bestimmte Alloantigene.
2. B-Zellen, die in der Bursa Fabricii geprägt werden, besitzen B-zellspezifische Determinanten, Membran-Ig, Rezeptoren, die spezifisch für Fc-Teile von Ig sind und mit denen sie Ig an ihre Membran binden können; Rezeptoren für C_3 , die die Konzentration von Ag-Ak-Komplexen, die Komplement gebunden haben, an die B-Lymphozytenmembranen ermöglicht (Zusammenfassend in Wick, 1979).
3. Makrophagen besitzen spezifische Oberflächenantigene, sowie für die Kooperation wichtige Rezeptoren für Proteinaggregate (Steinmann et al., 1972); Fc-Rezeptoren für IgG (Uhr et al., 1965), Rezeptoren für IgM (Rhodes, 1972); C_3 -Rezeptoren (Huber et al., 1968); Rezeptoren für verschiedene Lymphokine, z.B. den MIF (Migrationsinhibitionsfaktor; Fox et al., 1974).

Clamann (1969) erbrachte als Beispiel für die Zellkooperation die T-Zellabhängigkeit der B-Zellen für die Ak-Bildung. Eine hämolytische Ak-Bildung auf Schaferythrozyten konnte in

Milzzellkulturen von Mäusen nur nachgewiesen werden, wenn B- und T-Zellen vorlagen. Es scheint, daß T-Zellen für B-Zellen eine Helferfunktion übernehmen, die die Antwort der B-Zellen erleichtert oder initiiert, andererseits können T-Zellen aber auch supprimierend auf B-Zellen wirken (Mota in Bier, Götze, Dias da Silva, 1979). Ein weiteres Beispiel für die B-T-Zellinteraktion ist die verminderte humorale Reaktion bei thymektomierten Tieren (Greaves et al., 1974). T-Zellen können als Helferzellen agieren—darauf weist die T-zellabhängige Ak-Bildung hin (Miller et al., 1968)—als auch als Suppressorzellen auf B-zellabhängige Immunreaktionen wirken (Herzenberg et al., 1973). Auch T-T-Zellinteraktionen bzw. B-B-Zellinteraktionen sind bedeutend für die Immunsuppression bzw. für die Verstärkung der Immunantwort (Pincus et al., 1969; Graf et al., 1969; Cantor et al., 1971; Gershon et al., 1972).

Zahlreiche Autoren haben versucht, den Verlauf der DTH näher zu erforschen. Neta und Salvin (1974) haben festgestellt, daß in der Milz von sensibilisierten Meerschweinchen eine Suppressorzelle vorkommt, die sie als B-Suppressorzelle identifizierten, während Wishler und Stobo (1978) die Milzsuppressorzelle als T-Zelle interpretierten. Moticka (1977) fand heraus, daß die Suppressorzelle im Thymus gehäuft vorkam und nach einer Bursektomie fehlte. Sie erklärten den Tatbestand damit, daß die Suppression auf B-Zellen beruhte, die in den Thymus emigriert waren. Neta und Salvin (1976) trennten Milz- und Thymuszellen in B- und T-Zellen und stellten dabei fest, daß sowohl B-als auch T-Zellen eine

Suppressorfunktion hatten (jedoch nicht bei bursektomierten Hühnern), wobei die B-Zellen aber einen größeren immunsuppressiven Effekt zeigten als die T-Zellen. Ashershon hingegen führte die Suppression auf ein T-Zellprodukt zurück (1978).

Sürén et al. (1979) beschrieben die zellvermittelte Immunität nach Inkubation der Lymphozyten im Hinblick auf eine Thymidininkorporation in Abhängigkeit von der Menge an verabreichtem Antigen bzw. Mitogen. Minimale Ag-Mengen führten zu einer Immunsuppression, während optimale Ag-Konzentrationen einen Helfereffekt verursachten. Dennert (1974) beschrieb, daß bei der zellvermittelten Immunität bei Mäusen und Ratten auf xenogene Zellantigene hin vorwiegend T-Killerzellen beteiligt sind und von B-Zellen produzierte "Killer-Ak", die zur Lyse von Immunzellen führen.

Es steht häufig zur Diskussion, ob auch Ak einen stimulierenden bzw. hemmenden Einfluß auf die Tuberkulinreaktion ausüben. Eine verminderte DTH bei ansteigendem Ak-Spiegel beobachteten Mackaness et al. (1974), während Uhr et al. (1957) bereits zeigten, daß Ak-Ag-Komplexe eine verstärkte zellvermittelte Immunität mit sich bringen. Die Verstärkung dieser Reaktion könnten wir mit Hilfe der von Yoshida und Andersson (1972) aufgeführten T-Zellrezeptoren erklären, die mit IgG-Ag-Komplexen reagieren, hingegen im Gegensatz zu B-Zellen IgG für sich allein nicht erkennen. Dennert (1973) diskutierte den stimulierenden Einfluß von IgM auf die zellvermittelte Immunität.

Die Zellkooperation können wir uns mit Hilfe unterschiedlicher Hypothesen veranschaulichen:

1. Die T-Zellen können Ag über Trägerdeterminanten binden und so die Antigendeterminanten den B-Zellen in optimaler Form zur Verfügung stellen (Mitchison, 1971).

Die spezifische B-Zellaktivierung erfordert mindestens zwei Signale: die Bindung der Ag-Determinanten an membrangebundene Ig-Rezeptoren und ein weiteres noch nicht definiertes Signal von T-Helferzellen. Einige Ag werden thymusunabhängig genannt, da sie B-Lymphozyten direkt stimulieren können, sich zu Plasmazellen zu differenzieren, d.h. ohne die Hilfe von T-Lymphozyten. Diese Stimulierung führt zur Differenzierung IgM-synthetisierender Plasmazellen, ohne daß IgG gebildet wird (Mota, 1979).

2. Die Makrophagen nehmen das Ag auf (erstes Signal), nachdem die Rezeptoren (IgT) und die daran gebundenen Ag-Moleküle von den T-Zellen abdissoziiert sind und an die Makrophagenoberfläche gebunden wurden. Das zweite Signal erfolgt humoral. Beispielsweise spielt C_3 eine Rolle für die B-Zellaktivierung. Fehlt C_3 , so kommt es zu keiner Ak-Produktion (Feldmann et al., 1972; Schrader, 1973).

3. Ag wird an Makrophagen gebunden und die entsprechenden Trägerdeterminanten gleichzeitig den T- bzw. B-Zellen präsentiert = erstes Signal (Askonas et al., 1974). Das zweite Signal erfolgt humoral. Als humoraler Faktor

kommt z.B. ein von den T-Zellen produzierter Faktor in Frage, TRF (T-cell-replacing-factor), der T-Zellen ersetzt bzw. IgT. Zudem stehen Makrophagenfaktoren zur Diskussion, wie beispielsweise der C₃-Proaktivator (Steinmann et al., 1972). Außerdem besteht die Möglichkeit, daß T-Zellfaktoren nicht direkt auf B-Zellen einwirken, sondern Makrophagen zur Produktion eigener Faktoren anregen, die ihrerseits B-Zellen aktivieren (Wick, 1979).

Mediatorstoffe sind folglich von großer Bedeutung für die Zellkommunikation. So werden beispielsweise antigenspezifische und antigenunspezifische Mediatoren beschrieben, wobei noch nicht bekannt ist, ob es sich jeweils um verschiedene Mediatoren handelt oder ob der eine mit dem anderen dieser Mediatoren identisch ist (Rolle, M., Mayr, A., 1978).

Bei den nicht antigenspezifischen Mediatoren handelt es sich um folgende Substanzen:

1. Chemotaktische Faktoren, die Makrophagen anlocken;
2. Migrationsinhibitionsfaktor (MIF)
3. Makrophagenaktivierungsfaktor
4. Lymphotoxine, die Zellen zerstören
5. Ein blastogener oder mitogener Faktor (wirken auf nicht sensibilisierte T-Lymphozyten)
6. Proliferationshemmfaktor (hemmt die Vermehrung von nicht lymphoiden Zellen)
7. Hautreaktiver Faktor (löst bei Übertragung auf andere Tiere Reaktionen aus, die der Tuberkulinreaktion ähnlich sind).

Bei den antigenspezifischen Mediatoren wurde ein Transferfaktor nachgewiesen, der nicht sensibilisierte T-Lymphozyten in einen Zustand versetzt, daß sie nachfolgend mit dem Antigen reagieren können, das primär die zellulären Vorgänge ausgelöst hat. Vosmik et al. (1977) berichteten von Leukozytenprodukten (SRF, skin-reactive factor), die auf nicht sensibilisierte Hühner übertragen Hautanschwellungen hervorrufen, die histologisch der Tuberkulinreaktion ähnelten. Bennett und Bloom (1968) stellten fest, daß der MIF identische Hautreaktionen hervorruft. Maillard et al. (1972) wiesen darauf hin, daß der SRF in der MIF-Fraktion enthalten ist. Den SRF könnte man folglich mit dem MIF identifizieren bzw. ihn als eine Teilfraktion dessen auffassen; er wird vermutlich von den Lymphozyten gebildet. Eine Beteiligung von seiten der Makrophagen ist dabei jedoch nicht auszuschließen. Pick et al. (1969) identifizierten ihn mit Hilfe der Immunelektrophorese als ein Globulin.

Die gegebenen immunologischen Verhältnisse beim Huhn - das gesonderte Vorliegen der Bursa Fabricii - ermöglichen es, das B-Zellsystem aufgrund des getrennten Vorliegens einer primären B-Zellpopulation zu untersuchen. Die Ausschaltung des B-Zellsystems gelingt chirurgisch, chemisch oder hormonell (Zusammenfassend Lösch, 1978). Bei der kombinierten (hormonell-chemischen) Behandlung werden auch die Zellen in der Peripherie ausgeschaltet; eine Erholung des B-Zellsystems ist dabei nicht

gegeben. Bei der alleinigen hormonellen Bursektomie (Testosteronpropionat) wird die epitheliale Bursa-Anlage zerstört. Es resultierte eine Aufspaltung des Immunglobulinmusters in Normo-, Dys- und Hypogammaglobulinämien mit großer Erholungstendenz, während sich bei der kombinierten Anwendung eine permanente Agammaglobulinämie ergibt.

2. Einfluß von verabreichtem Serum und von appliziertem IgG auf die DTH

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten sensibilisierte, im Hause gezüchtete, dysgammaglobulinämische B12 - Hühner (Fiedler, Lösch, Håla, 1980), sowie immunologisch intakte Kontrolltiere.

Tierzahl: 10 Kontrolltiere

21 dysgammaglobulinämische B12 - Tiere

Man wählte nach Möglichkeit Tiere gleichen Alters.

Die Haltung erfolgte bei einem 12/12 Stunden Lichtprogramm auf Gitterrosten. Pelletiertes Legehennenalleinfutter und Wasser standen den Tieren frei zur Verfügung.

Die anfänglich gewählte Tierzahl konnte aufgrund von Tierverlusten nicht eingehalten werden, so daß während der letzten Versuchsreihe noch 18 dysgammaglobulinämische und 9 Kontrolltiere zur Verfügung standen.

2.1.2. Antigene

Die Sensibilisierung wurde mit CFA (Difco), das pro ml 0,5 mg abgetötete Mycobakterien enthielt, durchgeführt. Dieser Suspension wurden 10 mg Mycobacterium tuberculosis/ml CFA zugesetzt.

Die Mycobakterien wurden, nachdem sie in phosphat-gepuffelter NaCl-Lösung (PBS) ¹ aufgeschwemmt worden waren, bei 120 Grad C und 1 atü 45 Minuten lang autoklaviert und anschließend tiefgefroren und lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat wurde dann in CFA aufgenommen und homogenisiert. Zur Durchführung der Hautreaktion wurde "Gereinigtes Tuberkulin" (GT, Behringwerke) der Stärke 1000 benutzt.

2.1.3. Sensibilisierung

Die Sensibilisierung erfolgte durch Injektion von 1 ml der beschriebenen Adjuvanssuspension, verteilt auf zwei verschiedene Stellen der Brustmuskulatur.

2.1.4. Hauttest

Der Hauttest wurde grundsätzlich immer nach der Blutentnahme, sei es zur Serum- oder zur Leukozytengewinnung, durchgeführt. Dabei wurden 500 IE GT, gelöst in 0,1 ml NaCl mit einem Zusatz von 5 mg Phenol / ml in einen Kehllappen intracutan injiziert (500 IE GT entsprechen 10 µg PPD).

Zur Kontrolle diente der andere Kehll-

1 in mg/l

NaCl	8000
KCL	200
Na ₂ HPO ₄	1150
KH ₂ PO ₄	200

lappen, in den 0,1 ml des oben angegebenen Lösungsmittels ohne GT-Zusatz intrakutan injiziert wurden. Die Messung der Kehllappendicke erfolgte sowohl vor GT-Injektion, als auch 24 und 48 Stunden nach Injektion mit Hilfe des Schnelltasters (Fa. Kröplin). Der Grad der Hautreaktion bzw. der Schwellung des Kehllappens 24 bzw. 48 Stunden nach der Injektion wurde prozentual zur Kehllappendicke vor der Injektion ausgedrückt.

In der Ergebnisdarstellung wurde jeweils der Mittelwert der beiden Meßwerte herangezogen. In den Fällen, in denen die Schwellung auf den zur Kontrolle dienenden Kehllappen überging, wurde die Hautdickenzunahme beider Kehllappen prozentual zum Ausgangswert berechnet und addiert. Das GT wurde wegen der häufigen Verabreichung abwechselnd in den linken und rechten Kehllappen injiziert.

2.1.5. Applikation von Serumprotein

Mit Hilfe der Applikation von Serum bzw. IgG sollte geklärt werden, ob es dysgammaglobulinämischen Hühnern, im Gegensatz zu immunologisch intakten Kontrollhühnern, an aktiven Serumfaktoren mangelt, die eine Gegenregulation bewirken.

Dazu wurde

- a) Serum von sensibilisierten und nicht sensibilisierten dysgammaglobulinämischen Hühnern und

Kontrollhühnern ab der fünften Sensibilisierungswoche gewonnen, gepoolt und systemisch sowie lokal in den Kehllappen appliziert. Die lokale Verabreichung erfolgte unter Zusatz von 500 IE GT / 0,1 ml Serum. Zur Kontrolle diente stets der andere Kehllappen, in den 0,1 ml NaCl unter Zusatz von 500 IE GT injiziert wurden.

In Vorversuchen wurde Serum in unterschiedlichen Mengen von 0,5; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 und 8,0 ml intramuskulär verabreicht.

Die intravenöse Applikationsform konnte nicht angewandt werden, da die Hühner stets auf das Serum hin einem Schock mit tödlichem Ausgang erlagen. Glick et al. (1965) beschrieben analoge Ereignisse nach Verabreichung von Bursazellüberständen, die unter anderem Serum enthielten. Nur eine prophylaktische Gabe von Novadral[®] oder Cyproheptadin^R (einem Serotonin- und Histaminantagonisten) verhinderten anaphylaktoide Reaktionen.

Aufgrund der Vorergebnisse erwies sich eine intramuskuläre Serumdosierung von 2,0 ml als optimal. 6 ml Serum führten, unabhängig davon, ob das Serum von einem sensibilisierten oder nicht sensibilisierten Tier stammte, in jedem Fall zu einer Suppression der Hautreaktion.

Die Tuberkulinisierung erfolgte jeweils zwei Stunden nach Serumgabe. Die Messung der HDZ wurde, wie unter 2.1.4. bereits beschrieben, durchgeführt.

Zur Abklärung unspezifischer Einflüsse wurden 6 ml NaCl bzw. 6 ml Eigenserum intramuskulär gegeben; außerdem wurden 0,1 ml Eigenserum unter Zusatz von 500 IE GT intrakutan verabreicht.

Die Spendertiere wurden vor der Blutentnahme zur Serumgewinnung bezüglich der HDZ kontrolliert.

Die Empfängertiere tuberkulinisierte man vor Sensibilisierung und 47 Tage nach Sensibilisierung und drückte ihre HDZ prozentual zur Hautreaktion vor Tuberkulinisierung aus. 54 Tage nach Sensibilisierung wurde die HDZ nach intrakutaner Serumverabreichung getestet.

Nach zwei Wochen wurde zur Kontrolle die Hautdicke (nach Tuberkulinisierung) gemessen.

Eine Woche danach ging man schließlich auf die erwähnte intramuskuläre Serumapplikationsform über.

b) IgG wurde intramuskulär verabreicht, und zwar in steigenden Dosierungen, bis zu einer Höhe, die der physiologischen Serum-IgG-Konzentration normogammaglobulinämischer Hühner von 700 mg / kg KG entspricht. (Der IgG Gesamtpool eines 1 kg schweren Huhnes enthält im Mittel $537,5 \text{ mg} \pm 111,4 \text{ mg}$ IgG; Bohner 1977).

Die IgG-Präparation (Na_2SO_4 -Fällung) und die Trennung an Ultrogel Aca₃₄ und DEAE-Cellulose wurde von Herlyn, Lösch, Bohner, (1977) beschrieben.

2.2. Ergebnisse

In den Tabellen 1, 2, 3 und Figuren 1, 2 wird die HDZ in Abhängigkeit vom verabreichten Serum dargestellt.

1. Es zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen eine allgemein abnehmende Tendenz in der Hautreaktion nach intracutaner (i.c.) Serumapplikation im Vergleich zum Ausgangswert 47 Tage nach Sensibilisierung.
2. Aus Figur 1 und 2 geht hervor, daß nach intramuskulärer (i.m.) Verabreichung der verschiedenen Seren im Vergleich zum Ausgangswert 47 Tage nach Sensibilisierung eine abnehmende Hautreaktion resultierte. Lediglich bei der Übertragung von Serum sensibilisierter dysgammaglobulinämischer Hühner auf dysgammaglobulinämische Empfängertiere blieb die HDZ unverändert. Da sich dieses Ergebnis bei den Kontrollhühnern nicht bestätigte, können wir jedoch daraus keine Schlußfolgerungen ziehen.
Im Vergleich zur Zwischenkontrolle 68 Tage nach Sensibilisierung zeigte sich keine spezifische Einwirkung der unterschiedlichen Seren auf die HDZ.

- 3.) Ein Einfluß von seiten des IgG auf die Hautreaktion kann aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen werden.
- 4.) Nach der Eigenserum- und NaCl-Injektion änderte sich die HDZ nach Tuberkulinisierung nicht im Vergleich zum Ausgangswert.

Da sich unter 3.) und 4.) keine Abweichungen bezüglich der Hautreaktion ergaben, erübrigt sich eine graphische bzw. tabellarische Darstellung der Ergebnisse.

TAB. 1 a

HDZ% TAGE nach Sensibilisierung Spender sensibilisiert	KO nein					Dys nein															
	0)					0)															
0	32	4	0	6	7		20	4	15	24	32										
$\bar{x} \pm s$	10 $\pm$ 13						19 $\pm$ 10														
47	260	228	294	✓	165		✓	10	302	206	225										
$\bar{x} \pm s$	237 $\pm$ 55						186 $\pm$ 124														
54 1)	82	105	75	✓	184	315	94	180	✓	164	✓	161	314	125	122	✓	194	207	125	36	
$\bar{x} \pm s$	112 $\pm$ 50					188 $\pm$ 92					180 $\pm$ 91					166 $\pm$ 41					
68 2)	156	108	232	✓	266		✓	130	262	85	90										
$\bar{x} \pm s$	190 $\pm$ 72						147 $\pm$ 92														
75 3)	120	106	181	✓	160		✓	188	190	35	177										
$\bar{x} \pm s$	142 $\pm$ 35						148 $\pm$ 75														

Erklärung zu Tab. 1a): HDZ (%) nach Serumapplikation bei dysgammaglobulinämischen Hühnern

- 1) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml Serum + 10 µg GT
bzw. 0,1 ml PBS + 10 µg GT bei: -
- 2) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml PBS + 10 µg GT
(= Zwischenkontrolle)
- 3) HDZ (%) nach einer i.m. Serumapplikation von 2 ml
 $\bar{x} \pm s$ Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (%)
 ././ nicht durchgeführt aufgrund von Tierverlusten
 0) bezogen auf Einzeltiere

TAB.1 b

Spender HDZ % sensibilisiert TAGE nach Sensibilisierung	KO ja					DYS ja				
	0)					0)				
0	26	9	0	19	45	10	34	4	2	16
$\bar{x} \pm s$	20 $\pm$ 17					13 $\pm$ 13				
47	293	178	346	278	265	146	200	152	114	302
$\bar{x} \pm s$	272 $\pm$ 61					183 $\pm$ 73				
54 ¹⁾	244	198	286	410	150	182	115	193	264	142
$\bar{x} \pm s$	258 $\pm$ 91					179 $\pm$ 57				
68 ²⁾	125	78	456	194	284	84	160	227	75	287
$\bar{x} \pm s$	227 $\pm$ 149					167 $\pm$ 91				
75 ³⁾	118	186	251	258	200	241	44	229	104	236
$\bar{x} \pm s$	202 $\pm$ 56					183 $\pm$ 105				

Erklärung zu Tab. 1b): HDZ (%) nach Serumapplikation bei dysgammaglobulinämischen Hühnern

1) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml Serum + 10 μ g GT
bzw. 0,1 ml PBS + 10 μ g GT bei: —

2) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml PBS + 10 μ g GT
(= Zwischenkontrolle)

3) HDZ (%) nach einer i.m. Serumapplikation von 2 ml

$\bar{x} \pm s$ Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

././ nicht durchgeführt aufgrund von Tierverlusten

0) bezogen auf Einzeltiere

TAB. 2 a

Spender sensibilisiert HDZ % Tage nach Sensibilisierung der Empfänger	KO nein			—			DYS nein			—		
	O)						O)					
0	10		17				21		3			
$\bar{x} \pm s$	14 $\pm$ 5						12 $\pm$ 13					
47	358		50				159		450			
$\bar{x} \pm s$	204 $\pm$ 218						304 $\pm$ 206					
54 ¹⁾	260		52	106		55	46		54	62		225
$\bar{x} \pm s$	156 $\pm$ 147			80 $\pm$ 36			50 $\pm$ 6			144 $\pm$ 115		
68 ²⁾	122		30				28		98			
$\bar{x} \pm s$	76 $\pm$ 65						63 $\pm$ 49					
75 ³⁾	0		17				74		104			
$\bar{x} \pm s$	8 $\pm$ 12						89 $\pm$ 21					

Erklärung zu Tab. 2a): HDZ (%) nach Serumapplikation bei Kontrollhühnern

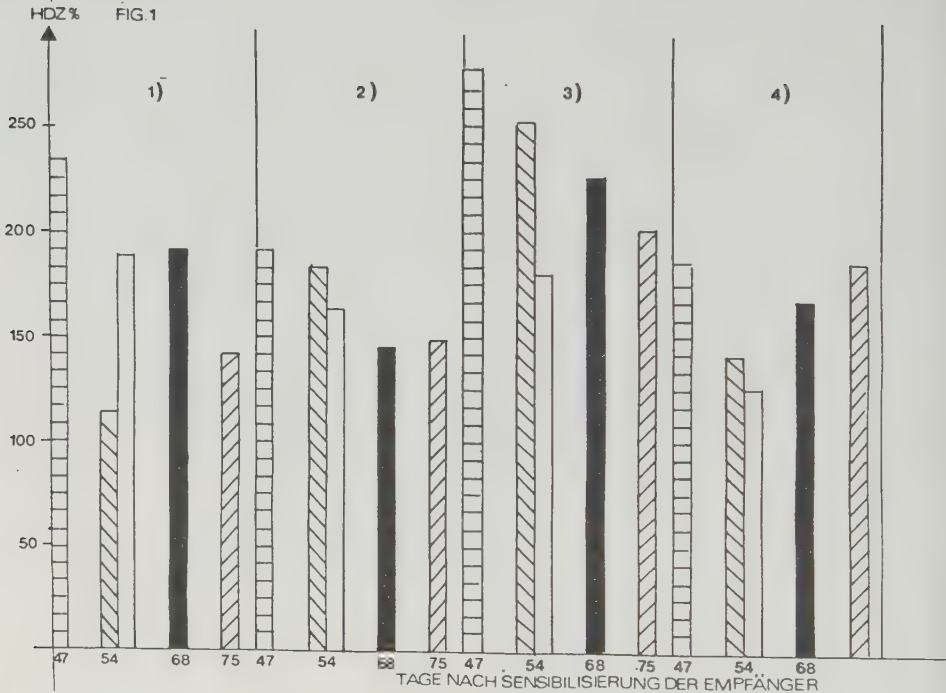
- 1) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml Serum + 10 μ g GT
bzw. 0,1 ml PBS + 10 μ g GT bei: —
- 2) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml PBS + 10 μ g GT
(= Zwischenkontrolle)
- 3) HDZ (%) nach einer i.m. Serumapplikation von 2 ml
 $\bar{x} \pm s$ Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
 o) bezogen auf Einzeltiere

TAB. 2b

Spender sensibilisiert HDZ% Tage nach Sensibilisierung der Empfänger KO ja 0) — DYS ja 0) —									
	1	15	10				16	18	28
0									
$\bar{x} \pm s$	9 ± 7						21 ± 6		
47	48	550	21				175	23	350
$\bar{x} \pm s$	206 ± 298						183 ± 163		
54 ¹⁾	42	338	87	26	223	1	97	205	223
$\bar{x} \pm s$	156 ± 160			83 ± 122			175 ± 68		148 ± 65
68 ²⁾	9	36	7				6	24	134
$\bar{x} \pm s$	22 ± 19						55 ± 69		
75 ³⁾	28	42	7				36	278	129
$\bar{x} \pm s$	35 ± 10						148 ± 122		

Erklärung zu Tab. 2b): HDZ (%) nach Serumapplikation bei Kontrollhühnern

- 1) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml Serum + 10 μ g GT
bzw. 0,1 ml PBS + 10 μ g GT bei: —
- 2) HDZ (%) nach i.c. Gabe von 0,1 ml PBS + 10 μ g GT
(= Zwischenkontrolle)
- 3) HDZ (%) nach einer i.m. Serumapplikation von 2 ml
 $\bar{x} \pm s$ Mittelwert $\pm$ Standardabweichung
 ./. nicht durchgeführt aufgrund von Tierverlusten
 0) bezogen auf Einzeltiere



Erläuterung zu Fig. 1): HDZ nach Serumapplikation bei dysgamma-
(siehe auch Tab. 1, 3) globulinämischen Hühnern

- 1) HDZ (%) nach Applikation von Serum nicht sensibilisierter Kontrolltiere
- 2) HDZ (%) nach Applikation von Serum nicht sensibilisierter dysgammaglobulinämischer Tiere
- 3) HDZ (%) nach Applikation von Serum sensibilisierter Kontrolltiere
- 4) HDZ (%) nach Applikation von Serum sensibilisierter dysgammaglobulinämischer Tiere



mittlere HDZ (%) vor Serumapplikation



mittlere HDZ (%) nach i.c. Applikation von 0,1 ml Serum + 10 μ g GT



mittlere HDZ (%) nach i.c. Applikation von 0,1 ml PBS + 10 μ g GT

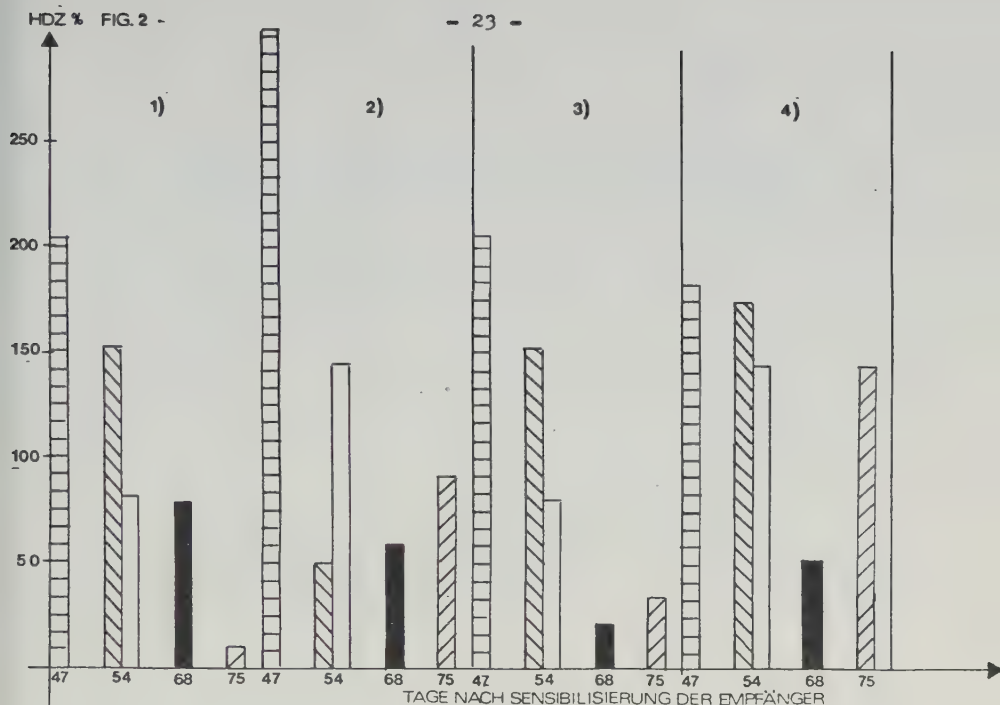


mittlere HDZ (%) nach i.c. Applikation von 0,1 ml PBS + 10 μ g GT (= Zwischenkontrolle)



mittlere HDZ (%) zwei Stunden nach i.m. Verabreichung von 2 ml Serum

HDZ % FIG. 2 -



Erläuterung zu Fig. 2): HDZ nach Serumapplikation bei normogamma-
(siehe auch Tab.2,3) globulinämischen Hühnern

- 1) HDZ (%) nach Applikation von Serum nicht sensibilisierter Kontrolltiere
- 2) HDZ (%) nach Applikation von Serum nicht sensibilisierter dysgamma-globulinämischer Tiere
- 3) HDZ (%) nach Applikation von Serum sensibilisierter Kontrolltiere
- 4) HDZ (%) nach Applikation von Serum sensibilisierter dysgamma-globulinämischer Tiere



mittlere HDZ (%) vor Serumapplikation



mittlere HDZ (%) nach i.c. Applikation von 0,1 ml
Serum + 10 µg GT



mittlere HDZ (%) nach i.c. Applikation von 0,1 ml
PBS + 10 µg GT



mittlere HDZ (%) nach i.c. Applikation von 0,1 ml
PBS + 10 µg GT (= Zwischenkontrolle)



mittlere HDZ (%) zwei Stunden nach i.m. Verabreichung von 2 ml
Serum

TAB 3

Differenzen in der HDZ (%) nach der Serumapplikation im Hinblick auf den Ausgangswert

Serum Empfänger	nicht sensibilisiertes Kontrollserum		sensibilisiertes Kontrollserum		nicht sensibilisiertes dysgamma-globulinämisches serum		sensibilisiertes dysgamma-globulinämisches serum	
	Abnahme	125 %	Abnahme	14 %	Abnahme	6 %	Abnahme	35 %
<u>i.c. Gabe</u> dysgammaaglobulinämisches normogammaaglobulinämisches	Abnahme	48 %	Abnahme	50 %	Abnahme	254 %	Abnahme	8 %
	Abnahme	196 %	Abnahme	171 %	Abnahme	215 %	Abnahme	35 %
<u>i.m. Gabe</u> dysgammaaglobulinämisches normogammaaglobulinämisches	Abnahme	95 %	Abnahme	70 %	Abnahme	38 %	Zunahme	0 %
	Abnahme	196 %	Abnahme	171 %	Abnahme	215 %	Abnahme	35 %

3. Einfluß eines Leukozytenproduktes (skin-reactive factor, SRF) auf die DTH.

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Tiermaterial

Als Leukozytenspender standen sensibilisierte dysgammaglobulinämische und sensibilisierte normogammaglobulinämische B12 - Tiere zur Verfügung, die unter Bedingungen wie unter 2.1.1. erwähnt, gezüchtet wurden. Als Empfängertiere dienten immunologisch intakte nicht sensibilisierte Kontrollhühner im Alter von 10 Monaten.

3.1.2. Leukozytenisolierung aus peripherem Blut von dysgammaglobulinämischen bzw. normogammaglobulinämischen B12 - Tieren und Inkubation der Zellen zur Bildung des SRF

Zur Gewinnung von Leukozyten aus peripherem Blut (PBL) wurden je Versuchstier 5 ml Blut aus der Vena jugularis steril entnommen. Pro ml wählte man 0,5 ml RPMI 1640 Medium (Seromed), dem 5 IU / ml Medium Heparin (Liquemin^R, La Roche) und 200 µg / ml Gentamycin (Refobacin^R, Merck) zugefügt wurden.

Das Blut wurde unter sterilen Bedingungen in verschließbare graduierte Zentrifugenröhrchen verbracht, die man, zur Sedimentation der Erythrozyten und Thrombozyten, 30 Minuten bei Raumtemperatur senkrecht stehenließ..

Anschließend folgte die Zentrifugation (5 min., 70 g). Das zellfreie Plasma und die Leukozyten im Leukozytensaum wurden in weitere sterile Zentrifugenröhrchen vorsichtig abpipettiert; anschließend wurden die Leukozyten zweimal in Hanks' Lösung ¹⁾ gewaschen, die 1 : 10 mit aqua bidestillata verdünnt worden war und mit Hilfe von 1,5 g NaHCO₃ / 1 Hanks' Lösung auf den physiologischen pH-Wert eingestellt worden war. Der Lösung wurden 200 µg Gentamycin (Refobacin^R) zugesetzt. Nach jeder Waschprozedur wurde 12 min. bei 400 g zentrifugiert.

Für die Methode ist eine Zellzahl von 1×10^7 Leukozyten optimal (Vosmik et al., 1977).

Die Blutleukozyten wurden nach Anfärbung mit Acridinorange (Serva) ²⁾ in der Neubauer-Zählkammer hinsichtlich ihrer Lebensfähigkeit ausgewertet; sie betrug ca. 90 bis 95 %.

1) in mg / l

NaCl	8000
KCL	400
Na ₂ HPO ₄	48
KH ₂ PO ₄	60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
CaCl ₂	140
Glucose	1000
Phenolrot	10

2) 2 % Lösung in 15 %

Essigsäure und
1 % Laktanacetat

Die Zellen wurden in Präzipitationsröhrchen in 1 ml RPMI 1640 aufgenommen, dem 10 x 200 mmol L-Glutamin (Seromed), sowie 200 µg Gentamycin (Refobacin^R) und 100 µg GT der Stärke 1000 zugefügt worden waren. Anschließend wurden die Leukozyten bei 37 Grad C, 5 % CO₂, 24 Stunden lang inkubiert. Danach wurden die Leukozyten nochmals aufgewirbelt und die Lebensfähigkeit der Zellen wiederholt mit Acridinorange getestet.

3.1.3. Transfer des SRF von dys- bzw. normogammaglobulinämischen Hühnern auf nicht sensibilisierte Kontrolltiere

Die Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert (5 min., 400 g). Anschließend wurden jeweils 0,1 ml des Überstandes in den Kehllappen der bereits unter 3.1.1. erwähnten Kontrolltiere injiziert. Der andere Kehllappen diente zur Kontrolle. Dabei wurde unter gleichen Bedingungen inkubiertes Medium ohne jegliche Zusätze appliziert.

Aufgrund bereits vorliegender Ergebnisse bezüglich der DTH dysgammaglobinämischer Hühner (Scheu, 1978) führte man die Versuche vor Sensibilisierung, sowie 21, 35 und 147 Tage nach Sensibilisierung der Spendertiere durch.

Für jede Versuchsreihe wählte man neue Empfängertiere. Aus Vorversuchen ging nämlich hervor, daß die Hühner bei wiederholter SRF-Verabreichung eine verstärkte Hautreaktion zeigten. Dies ist vermutlich auf eine Reaktion vom Soforttyp zurückzuführen.

Gemessen wurde jeweils die Hautdickenzunahme der nicht sensibilisierten Kontrolltiere vor Applikation des SRF und vier Stunden nach der Injektion (Vosmik et al., 1977). Die HDZ wurde in Prozent der Hautdicke des injizierten Kehllappens vor der SRF-Applikation ausgedrückt. Nach 24 Stunden war die Reaktion völlig abgeklungen.

Parallel dazu wurde die Hautreaktion der Spender nach Tuberkulinisierung gemessen. Die Hautdickenzunahme von Spendern und Empfängern wurde tabellarisch dargestellt (Tab. 4, 5, 6, 7;)

3.2. Ergebnisse

Aus den Tabellen 4, 5, 6 und 7 geht hervor, daß die dysgammaglobulinämischen Tiere zwar den skin-reactive factor produzieren, jedoch aufgrund eines Mittelwertvergleichs 147 Tage nach Sensibilisierung nicht in erhöhtem Maße, wie nach der HDZ von 516 % (Tab. 6 des dysgammaglobulinämischen Spendertieres im Gegensatz zu den 42 % (Tab. 7) des normogammaglobulinämischen Spender-tieres zu erwarten gewesen wäre. 35 Tage nach Sensibilisierung

resultierte ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) der Mittelwerte der Hautdickenzunahmen nach SRF-Injektion von dys- bzw. normogammaglobulinämischen Spendertieren. (Tab. 4 und 5). Da sich der Unterschied 147 Tage nach Sensibilisierung jedoch nicht bestätigte, läßt sich ein gesetzmäßiger Einfluß des skin-reactive factors im Hinblick auf die Gegenregulation bei normogammaglobulinämischen Hühnern ausschließen.

Die Signifikanzangaben beim Vergleich der Mittelwerte der Empfängergruppen (Tab. 8) beruhen auf dem U-Test (Wilcoxon, Mann , Whitney, 1976)..

TAB. 4

Tage nach Sensibilisierung der Spender (Nr.)	I	II	III	IV
	0	21	35	147
744	7	200	195	—
	9	100	238	
	11	85	321	
	$\bar{x} \pm s$ 9 ± 2	$\bar{x} \pm s$ 128 ± 62	$\bar{x} \pm s$ 244 ± 54	
749	0	41	288	—
	28	25	230	
	5	75	312	
	$\bar{x} \pm s$ 11 ± 15	$\bar{x} \pm s$ 47 ± 26	$\bar{x} \pm s$ 279 ± 35	
755	7	43	200	46
	25	33	150	43
	17	44	143	100
	$\bar{x} \pm s$ 16 ± 9	$\bar{x} \pm s$ 40 ± 6	$\bar{x} \pm s$ 164 ± 31	$\bar{x} \pm s$ 63 ± 32
$\bar{x}$ total ± s	12 ± 9	72 ± 54	235 ± 61	63 ± 32

Erläuterung zu Tab. 4:

HDZ (%) nicht sensibilisierter Empfänger vier Stunden nach Transfer des skin-reactive factors sensibilisierter dysgamma globulinämischer Hühner

- $\bar{x} \pm s$ Mittelwert der HDZ (%) vier Stunden nach SRF-Injektion in den Kehllappen $\pm$ Standardabweichung (jeweils auf eine Empfängergruppe bezogen)
- $\bar{x}$ total $\pm s$ s.o., bezieht sich jedoch auf alle SRF-Empfänger unter Berücksichtigung des Sensibilisierungszeitpunkts der Spender
- nicht durchgeführt aufgrund von Tierverlusten

TAB. 5

Tage nach Sensibilisierung der Spender (Nr.)	V	VI	VII	VIII
	0	21	35	147
751	5	25		
	5	65		
	28	100	—	—
	$\bar{x} \pm s$ 13 ± 13	$\bar{x} \pm s$ 63 ± 38		
752	0	87	—	
	27	100	186	
	5	157	300	—
	$\bar{x} \pm s$ 11 ± 14	$\bar{x} \pm s$ 115 ± 37	$\bar{x} \pm s$ 243 ± 81	
772	8	50	225	5
	8	36	71	60
	19	87	150	6
	$\bar{x} \pm s$ 11 ± 7	$\bar{x} \pm s$ 58 ± 26	$\bar{x} \pm s$ 149 ± 77	$\bar{x} \pm s$ 24 ± 31
786	10	88	57	
	11	117	120	
	23	32	73	—
	$\bar{x} \pm s$ 15 ± 7	$\bar{x} \pm s$ 79 ± 43	$\bar{x} \pm s$ 83 ± 33	
$\bar{x}$ total ± s	12 ± 10	79 ± 39	148 ± 85	24 ± 31

Erläuterung zu Tab. 5:

HDZ (%) nicht sensibilisierter Empfänger vier Stunden nach Transfer des skin-reactive factors sensibilisierter normogammaglobulinämischer Hühner

$\bar{x} \pm s$

Mittelwert der HDZ (%), vier Stunden nach SRF-Injektion in den Kehllappen ± Standardabweichung

$\bar{x}$ total ± s

s.o., bezieht sich jedoch auf alle SRF-Empfänger unter Berücksichtigung des Sensibilisierungszeitpunkts der Spender

—

nicht durchgeführt aufgrund von Tierverlusten

TAB. 6 HDZ (%) der dvsgammaglobulinämischen Leukozytenspender

Tage nach Sensibili- sierung Spender (Nr.)	0	21	35	147
744	11	218	335	516
749	11	390	204	—
755	24	522	498	—
$\bar{x} \pm s$	15±8	377±152	346±147	—

TAB. 7 HDZ (%) der normogammaglobulinämischen Leukozytenspender

Tage nach Sensibili- sierung Spender (Nr.)	0	21	35	147
751	41	331	—	—
752	7	172	200	—
772	10	242	275	42
786	20	30	17	—
$\bar{x} \pm s$	20±15	194±127	164±133	—

Erläuterung zu Tab. 6 und 7:

$\bar{x} \pm s$ Mittelwert der HDZ (%) jeweils auf den 24- und 48-Stundenwert bezogen (siehe unter 2.1.4.)

— nicht durchgeführt aufgrund von Tierverlusten

Tab. 8: Statistischer Vergleich der Mittelwerte der

Empfängertiere

(Ergänzung zu Tab. 3 und 4)

II bezügl. I	:	$p < 0,002$
III bezügl. II	:	$p < 0,002$
VI bezügl. V	:	$p < 0,002$
VII bezügl. VI	:	$p > 0,05$
VI bezügl. II	:	$p > 0,05$
VII bezügl. III:		$p < 0,05$

Erläuterung zu Tab. 8:

p = Irrtumswahrscheinlichkeit

Die Signifikanzangaben beruhen auf dem U-Test nach Wilcoxon, Mann, Whitney (Sachs, 1976).

4. Transfer "DTH-regulierender Aktivität" sensibilisierter normogammaglobulinämischer B12 - Hühner in sensibilisierte kompatible dysgammaglobulinämische Hühner mit persistierender DTH-Reaktion

4.1. Material und Methoden

Um die Regulation der DTH bei dysgammaglobulinämischen Hühnern durch Leukozyten näher zu ergründen, wurde eine Tierzahl von jeweils 9 dysgammaglobulinämischen Hühnern und 12 immunologisch intakten, normogammaglobulinämischen, im Hause gezüchteten Hühnern der Linie B12 herangezogen.

Die Bedingungen der Tierhaltung entsprachen den unter 2.1.1. erwähnten.

4.1.2. Gewinnung der Leukozytenkulturen

Die Leukozyten wurden, wie unter 3.1.2. beschrieben, gewonnen. Man wählte eine Zellzahl von 1×10^7 Leukozyten.

4.1.3. Durchführung der Untersuchungen

4.1.3.1. Übertragung der Leukozyten von dysgammaglobulinämischen auf dysgammaglobulinämische bzw. von normogammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische Hühner

Die Leukozyten wurden jeweils in 1 ml PBS (phosphate buffer saline) aufgenommen und acht Wochen nach Sensi-

bilisierung wechselseitig zwischen je zwei dysgamma-globulinämischen bzw. je zwei normogammaglobulinämischen Hühnern intravenös (i.v.) übertragen, so daß aufgrund der gewählten Tierzahl zwischen den dysgammaglobulinämischen Tieren viermal und zwischen den normogammaglobulinämischen Tieren fünfmal ein wechselseitiger Zelltransfer vorgenommen wurde. Wir wählten dabei einen Zeitpunkt, zu dem bereits bei den Kontrolltieren die Gegenregulation eingetreten ist. Eine Woche nach dem Zelltransfer wurden die Tiere zur Zwischenkontrolle bezüglich der Hautreaktion getestet.

- 4.1.3.2. Übertragung der Leukozyten von dysgammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische bzw. von normogammaglobulinämischen auf dysgammaglobulinämische Hühner
- 10 Wochen nach Sensibilisierung wurde ein weiterer Leukozytentransfer durchgeführt, diesmal wechselseitig von einem dysgammaglobulinämischen auf ein normogammaglobulinämisches bzw. von einem normogammaglobulinämischen auf ein dysgammaglobulinämisches Huhn. Die Tuberkulinisierung wurde jeweils 24 Stunden, sowie eine Woche nach dem Zelltransfer durchgeführt und die HDZ, wie unter 2.1.4. dargestellt, gemessen.
- 11 Wochen und 14 Wochen nach Sensibilisierung wurde zur Nachkontrolle die Tuberkulinisierung der Empfänger-tiere wiederholt.

4.2. Ergebnisse

Aus Fig. 3 und den Tab 9 und 10 erkennt man, daß sich nach Injektion von Leukozyten normogammaglobulinämischer B12-Tiere auf dysgammaglobulinämische B12-Tiere(Fig. 3) in der HDZ ein Abfall von $352\% \pm 94$ auf $232\% \pm 164$ ergibt. Dieser Wert blieb auch noch eine Woche nach der Zellübertragung erhalten($p < 0,05$).

Bei den normogammaglobulinämischen B12-Tieren zeigte sich eine abfallende Tendenz ab der dritten Woche nach Sensibilisierung(Fig. 3, Tab.10), was sich vermutlich aus der Gegenregulation bei immunologisch intakten Kontrollhühnern erklärt.

Ein verstärkender Einfluß auf die Hautreaktion , hervorgerufen durch Helferzellen, läßt sich aufgrund des Leukozytentransfers von dysgammaglobulinämischen Hühnern auf normogammaglobulinämische Hühner(Fig. 3)aus-schließen.

Folglich können wir zusammenfassend feststellen, daß innerhalb der Leukozyten eine Subpopulation von Suppressorzellen bzw. eine immunsupprimierend wirkende Immunzellinteraktion bei immunologisch intakten Kontrolltieren ab der dritten Woche nach Sensibilisierung im Vergleich zu den dysgammaglobulinämischen Hühnern verstärkt auftritt.

TAB. 9

Tiere (Nr.) \ Tage nach Sensibili- sierung	I						II					
	0	21	35	49	56	57	63	70	71	77	98	
753	6	331	220	188	1)	248	316	2)	26	—	—	
744	11	218	355	290	1)	473	410	2)	40	192	578	
749	12	390	204	428	1)	330	400	2)	284	280	—	
750	0	220	300	225	1)	272	400	2)	252	233	326	
736	0	430	477	622	1)	426	398	2)	282	269	389	
755	24	522	498	278	1)	88	318	2)	194	304	545	
650	2	306	281	520	1)	497	356	2)	550	220	477	
732	19	178	410	569	1)	404	444	—	(511)	(498)	—	
796	10	276	358	327	1)	141	130	2)	224	142	300	
MWds	9±8	319 ±112	345±104	383±157		320±144	352±94		232±164	234±56	436±115	

Erläuterung zu Tab. 9:

Verlauf der HDZ (%) nach einem Leukozytentransfer auf dys-
gammaglobulinämische B 12-Hühner 56 und 70 Tage nach
Sensibilisierung

- 1) Übertragung von 1×10^7 Leukozyten dysgammaglobulinämischer B12-Tiere
- 2) Übertragung von 1×10^7 Leukozyten normogammaglobulinämischer B12-Tiere

— nicht durchgeführt

Signifikanz II bzgl. I: $p < 0,05$

(Die Signifikanzangabe beruht auf dem U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney)

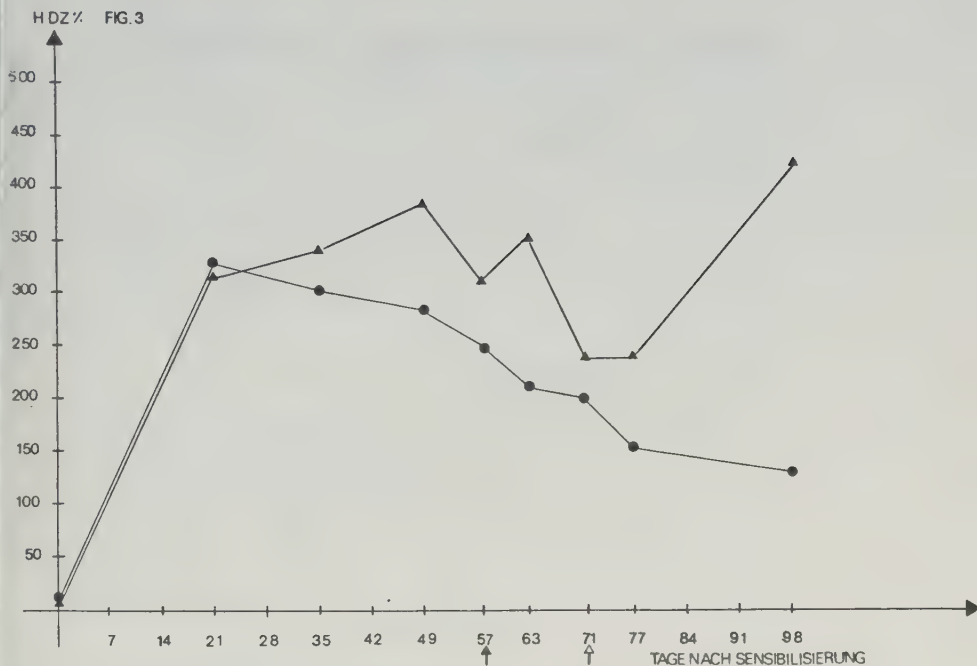
TAB. 10

Tiere (Nr.) \ Tage nach Sensibili- sierung	0	21	35	49	56	57	63	70	71	77	98
783	9	348	246	300	1)	229	219	—	(178)	(138)	(129)
751	4 1	351	—	(492)	—	(150)	—	—	—	—	—
752	7	172	200	290	1)	194	207	2)	275	189	329
771	6	667	530	392	1)	270	360	2)	321	218	—
762	5	198	325	226	1)	190	214	2)	162	80	50
766	4	322	250	357	1)	131	64	2)	—	—	—
811	6	338	272	191	1)	108	199	2)	158	161	120
772	10	242	275	188	1)	519	280	2)	200	206	40
786	20	30	17	40	1)	56	34	2)	9	18	31
653	5	360	556	423	1)	238	304	2)	275	152	136
654	2	526	423	451	1)	653	—	—	—	—	—
656	19	339	279	254	1)	158	241	2)	226	189	236
MW±s	11 ± 11	324±163	307±152	283±121	1)	250±180	212±100	2)	203±97	152±69	135±112

Erläuterung zu Tab. 10:

Verlauf der HDZ (%) nach einem Leukozytentransfer auf normogammaglobulinämische B12-Hühner 56 und 70 Tage nach Sensibilisierung

- 1) Übertragung von 1×10^7 Leukozyten normogammaglobulinämischer B12-Tiere
- 2) Übertragung von 1×10^7 Leukozyten dysgammaglobulinämischer B12-Tiere
- nicht durchgeführt



Erklärung zu Fig. 3: HDZ (%) vor und nach einem Leukozyten-
transfer von 1×10^7 Zellen

- HDZ (%) der normogammaglobulinämischen Hühner
- ▲ HDZ (%) der dysgammaglobulinämischen Hühner
- ↑ HDZ 24 Stunden nach Leukozytentransfer von dysgammaglobulinämischen auf dysgammaglobulinämische bzw. von normogammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische Hühner
- △ HDZ 24 Stunden nach Leukozytentransfer von dysgammaglobulinämischen auf normogammaglobulinämische bzw. von normogammaglobulinämischen auf dysgammaglobulinämische Hühner (vgl. Tab. 9 und 10).

5. Effekt der Tuberkulinisierung auf sensibilisierte,
chemisch "bursektomierte" Hühner

5.1. Material und Methoden

5.1.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere dienten Leghornküken der Heisdorf-Nelson-Lohmann (HNL) Legerasse. Es standen 51 Versuchstiere zur Verfügung; 5 Tiere dienten als Kontrolle.

5.1.2. Chemische "Bursektomie"

Zur experimentellen Erzeugung einer Dys- bzw. Agammaglobulinämie wurden drei Tage lang bebrütete Hühner-eier in eine 2,0 bzw. 2,5 prozentige Testosteron-propionatlösung (TP 2,0 bzw. 2,5; Äthanol 99- prozentig) 5 Sekunden lang mit dem spitzen Pol bei einer Temperatur von 5°C , 3,5 cm tief eingetaucht.

50 % der geschlüpften Küken wurde zusätzlich an den ersten vier Lebenstagen je 2 mg Cyclophosphamid (CY) (Lösch, Fiedler, Herlyn, Hoffmann-Fezer, 1977) intramuskulär injiziert.

Die Anzahl der mit TP bzw. kombiniert (TP + CY) behandelten Tiere und deren Überlebensrate gehen aus Tab. 11 hervor. Auch die Anzahl der erhaltenen Dys- bzw. Agammaglobulinämien in Abhängigkeit von der jeweils gewählten Methode sind aus Tab. 11 ersichtlich. Die Sensibilisierung erfolgte im Alter von 7 Wochen. Es wurden 0,6 ml der unter 2.1.2. beschriebenen Adjuvanssuspension intramuskulär in die beiden Oberschenkel appliziert.

Darauf wurde eine Verlaufsuntersuchung bezüglich der Hautreaktion über einen Zeitraum von 77 Tagen und eine nochmalige Untersuchung im Abstand von 147 Tagen nach Sensibilisierung vorgenommen. Die Hautdickenzunahme wurde wöchentlich, wie bereits unter 2.1.4. beschrieben, gemessen und ausgedrückt (siehe Tab. 12). Der Ig-Status wurde dabei laufend immunelektrophoretisch kontrolliert.

5.1.3. Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese (IE; Scheidegger, 1955) wurde wöchentlich parallel zur Tuberkulinisierung durchgeführt. Die Blutabnahme hierfür wurde stets vor der Tuberkulinisierung vorgenommen.

5.1.4. Statistische Methode

Der Vergleich der Mittelwerte zwischen den experimentell erzeugten agammaglobulinämischen Tieren und den Kontrolltieren hinsichtlich der Hautreaktion erfolgte nach dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney (Sachs, 1976).

5.2. Ergebnisse

Aus Fig. 4 und den Tab. 12, 13 ersieht man, daß die experimentell erzeugten agammaglobulinämischen Tiere, im Vergleich zu den Kontrolltieren und zu den vorliegenden Daten der Allergie vom verzögerten Typ genuin dysgammaglobulinämischer Tiere (Scheu, 1978)

bezüglich der Hautdickenzunahme (HDZ) zwischen den beiden genannten Gruppen liegen.

In der sechsten und neunten Versuchswoche nach Sensibilisierung zeigt sich bei den agammaglobulinämischen Tieren jeweils ein Peak:

- In der sechsten Woche mit einer durchschnittlichen prozentualen HDZ von $267 \% \pm 80$, gegenüber einem mittleren Kontrollwert von $209 \% \pm 66$ (die Differenz ist nicht signifikant; $p > 0,05$).
- In der neunten Versuchswoche resultiert ein Wert von $265 \% \pm 168$ gegenüber einem Kontrollwert von $119 \% \pm 79$ (die Differenz ist signifikant; $p < 0,06$).

Auch in der zehnten und elften Versuchswoche liegt der Wert der HDZ über dem Mittelwert der Kontrolltiere; in der 21. Woche ergibt sich noch eine Differenz von 80% .

Von den experimentell erzeugten dysgammaglobulinämischen Hühnern überlebten drei Tiere, die bezüglich der HDZ den normogammaglobulinämischen entsprechen (nicht dargestellt).

TAB.11

BEHANDLUNG	2,0prozentige TP-Lösung CY 4mg	2,0prozentige TP-Lösung CY -	2,5 prozentige TP-Lösung CY 4mg	2,5 prozentige TP-Lösung CY -	ohne Behandlung
n_0	48		50		12
n_1	28		23		10
n_2	11	17	10	13	10
n_3	9	17	9	13	10
n_4	8	12	5	13	10
n_5	8	3	4	4	
n_6	0	1	0	3	
n_7	0	8	1	6	
n_8	2	7	2	6	5

Erklärung zu Tab. 11:

Anzahl der chemisch "bursektomierten" Küken, deren Mortalitäts- und Überlebensrate in Abhängigkeit von der gewählten Methode

- n_0 : Anzahl der mit TP behandelten Küken und der Kontrollküken
 n_1 : geschlüpfte Küken
 n_2 : CY-Behandlung (+) bzw. ohne CY_ Behandlung (-)
 n_3 : überlebende Tiere nach erster Lebenswoche
 n_4 : überlebende Tiere nach siebter Lebenswoche
 n_5 : agammaglobulinämische Küken
 n_6 : dysgammaglobulinämische Küken
 n_7 : normogammaglobulinämische Küken
 n_8 : sensibilisierte Tiere

TAB. 12

TAGE NACH SENSIBILISIERUNG	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	147
n	8	7	7	7	6	6	5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x} \pm s$ (%)	7 ± 5	52 ± 25	82 ± 39	101 ± 71	158 ± 44	134 ± 85	267 ± 80	214 ± 94	210 ± 34	255 ± 68	153 ± 91	116 ± 81	112 ± 74

TAB. 13

TAGE NACH SENSIBILISIERUNG	0	7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	77	147
n	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
$\bar{x} \pm s$ (%)	13 ± 11	90 ± 56	98 ± 96	124 ± 43	179 ± 18	205 ± 30	209 ± 66	185 ± 105	95 ± 76	119 ± 79	105 ± 78	69 ± 42	32 ± 12

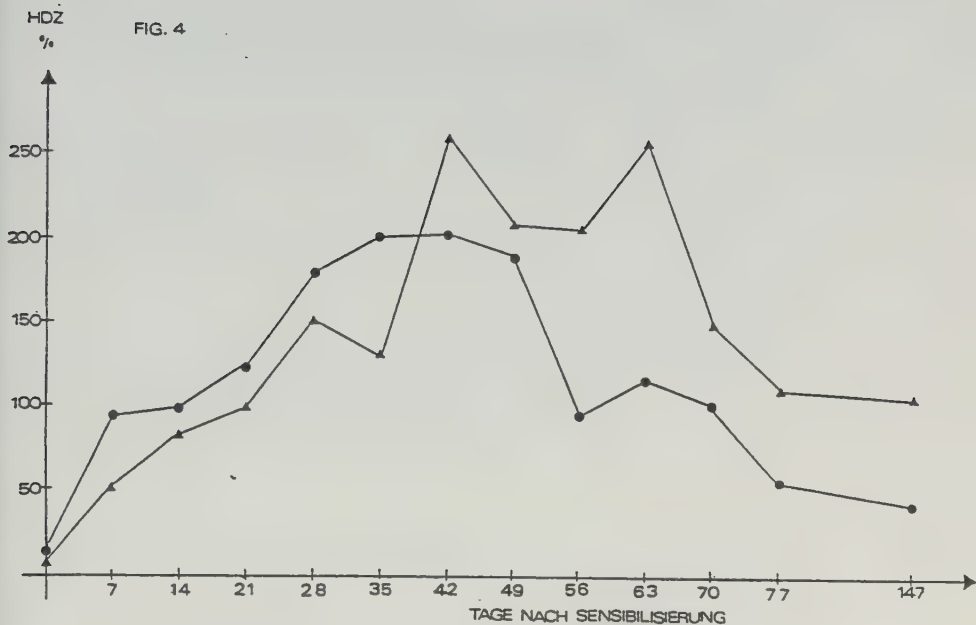
Erläuterung zu Tab. 12 und 13

HDZ (%) bei chemisch "burspektomierten", agammaglobulinämischen Hühnern (Tab.12) bzw. bei Kontrollhühnern (Tab. 13)
(vgl. Fig. 3)

n = Tierzahl

$\bar{x} \pm s$ = Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

FIG. 4



Erläuterung zu Fig. 4

HDZ (%) bei chemisch "bursektomierten", agammaglobulinämischen Hühnern bzw. bei Kontrollhühnern

- ▲ HDZ (%) bei chemisch "bursektomierten", agammaglobulinämischen Hühnern
- HDZ (%) bei Kontrollhühnern

6. Diskussion

6.1. Einfluß von Serum sensibilisierter Kontrollhühner
auf die DTH dysgammaglobulinämischer Hühner

6.1.1. Besprechung der Methoden

Man wählte bei der intramuskulären Serumverabreichung eine Dosierung von jeweils 2 ml, da eine höhere Dosis die Sensitivität der Tiere hinsichtlich der DTH einschränkte: In Vorversuchen resultierte daraus eine Abnahme der Hautdickenzunahme, unabhängig von der Art des verabreichten Serums. Zum anderen erwies sich eine niedrigere Serummenge als zu wenig effektiv bezüglich der Aussagekraft der Hautreaktion.

Obwohl Mackaness et al. (1978) bei Mäusen feststellten, daß blockierende Serumfaktoren nur dann immunsuppressiv wirkten, wenn sie intravenös verabreicht wurden, mußte man auf die lokale (0,1 ml Serum i.c.) und intramuskuläre Applikationsform übergehen. Die lokale Verabreichung zielte darauf ab, die Wirkung der blockierenden Faktoren auf die ins Reaktionsgebiet eingewanderten Immunzellen zu testen. Die systemische Applikation hingegen sollte vor allem einen Effekt der Faktoren auf die B-T-Zellinteraktion vor Auslösung der Tuberkulinreaktion erzielen.

Die intravenöse Injektion von Serum führte stets zu einem Schock mit tödlichem Ausgang. Glick et al. beobachteten 1965 analoge anaphylaktische Reaktionen

nach der intravenösen Übertragung von Bursa-
zellüberständen, die u.a. Serum enthielten.

Derartige Reaktionen konnten zwar mit Cyproheptadin,
einem Antihistaminikum, verhindert werden; da jedoch
Cyproheptadin - wie zu erwarten war - die Hautreaktion
teilweise oder ganz unterdrückte, mußte auf diese
Applikationsform verzichtet werden.

Das Serum gewann man ab der 6. Sensibilisierungswoche,
einem Zeitpunkt, zu dem die Gegenregulation bei den
Kontrolltieren eingetreten ist (Scheu, 1978) und dem-
nach der spekulativ angenommene Faktor im Serum vor-
handen sein mußte.

6.1.2. Besprechung der Ergebnisse

Es erhob sich eingangs die Frage, ob im Serum immuno-
logisch intakter, sensibilisierter Kontrollhühner
gegenregulierend wirkende Faktoren bezüglich der DTH
vorliegen, die den sensibilisierten dysgammaglobuli-
nämischen Hühnern fehlen.

Wenn von dieser Arbeitshypothese ausgegangen wird,
wären folgende Resultate zu erwarten:

1. Nach der Applikation von Serum unsensibilisierter
Kontroll- und dysgammaglobulinämischer Tiere sollten
sowohl bei den dysgammaglobulinämischen als auch
den immunologisch intakten Empfängerhühnern keine
veränderten Hautreaktionen auftreten.

2. Nach der Applikation von Serum sensibilisierter dysgammaglobulinämischer Hühner sollte es sowohl bei den dysgammaglobulinämischen als auch bei den Kontrollhühnern zu keiner Abnahme der Hautreaktion kommen. Falls im Serum von dysgammaglobulinämischen Hühnern die Immunantwort verstärkende Faktoren vorhanden wären, so sollte die Hautreaktion im Vergleich zum Ausgangswert vor Serumgabe zunehmen. Verstärkende Faktoren könnten sich beispielsweise über eine Inaktivierung von Suppressorzellen bzw. eine Aktivierung von Helferzellen auswirken.
3. Nach der Applikation von Serum sensibilisierter Kontrollhühner sollte es sowohl bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern, als auch bei den Kontrollhühnern zu einer Gegenregulation auf die Serumübertragung hin kommen. Die die DTH supprimierenden Faktoren könnten möglicherweise Suppressorzellen aktivieren bzw. über eine Verminderung oder Ausschaltung von Helferzellen wirken. Andererseits könnten sie auch bei der lokalen Seruminjektion die Zellen direkt beeinflussen und ihre Abwanderung aus dem Reaktionsgebiet veranlassen bzw. die Abgabe von eventuell vorkommenden Reaktionsprodukten an den Ort der Tuberkulinisierung verhindern.

Bei der Untersuchung dieses Tatbestands stellten wir diesbezüglich keine Gesetzmäßigkeiten fest. Sowohl nach intrakutaner als auch nach intramuskulärer Serumapplikation ergab sich im Vergleich zum Ausgangswert 47 Tage nach Sensibilisierung eine abnehmende Tendenz der Hautreaktion nach Tuberkulinisierung. Lediglich bei der Übertragung von sensibilisiertem dysgamma globulinämischem Serum auf sensibilisierte dysgamma globulinämische Tiere blieb die Hautdickenzunahme im Vergleich zum Ausgangswert unverändert. Da sich dieses Ergebnis aber bei der Kontrollgruppe unter den gleichen Bedingungen nicht bestätigte und es auch nach der Serumverabreichung von nicht sensibilisierten Tieren zu einer abnehmenden Hautreaktion kam, läßt sich eine Gesetzmäßigkeit in Abhängigkeit von der Art des jeweiligen Serums und dem daraus resultierenden Effekt auf die Allergie vom verzögerten Typ ausschließen. (siehe Fig. 1, 2 und Tab. 1, 2, 3). Die abnehmende Tendenz der Hautreaktion auf die Fremdseruminjektion hin könnte auf eine Cortisonfreisetzung zurückzuführen sein. Beim Huhn muß bzgl. der Fremdserumverträglichkeit eine Besonderheit vorliegen. Dafür sprechen auch die anaphylaktoiden Reaktionen nach intravenöser Serumverabreichung. Cortison beeinflusst Immunreaktionen, wie auch Folch und Waksman (1974) bei ihren Untersuchungen feststellten: Nach Splenektomie von mit Cortison vorbehandelten Ratten untersuchten sie die Suppressorfähigkeit der Milzzellen bzgl. der RNA-, DNA- und Proteinsynthese in der Zellkultur. Dabei stellten sie fest, daß die Anzahl der Suppressorzellen nach Cortisonbehandlung in der Milz abnahm und somit die Proteinsynthese

der kultivierten Zellen nicht bzw. weniger supprimiert wurde. Die Abnahme der Suppressorzellen könnte entweder auf einer Abwanderung der Suppressorzellen aus der Milz beruhen bzw. auf einer verminderten Einwanderung in die Milz. Die Suppressorzellen wären somit vermehrt im Kreislauf vorhanden und könnten in verstärktem Ausmaß in die E - T - Zellinteraktion eingreifen. Daraus könnten wir den Schluß ziehen, daß bei unseren Hühnern vermutlich auf das Serum hin analoge immunologische Verhaltensmuster vorlagen. Die Wichtigkeit der Milz für die Immunreaktion im Hinblick auf die Gegenregulation, wird u.a. von Mackaness et al. (1978) betont. Sie diskutieren die Wirkung von blockierenden Faktoren in Abhängigkeit von einer intakten Milz. Diese Gegebenheit untersuchten sie bei Mäusen nach der Verabreichung von Serum, das vorher zusammen mit Milzzellen inkubiert worden war, die DTH-blockierende Faktoren abgaben. Splenektomierte Mäuse hingegen zeigten keine Suppression. Mackaness et al (1978) erläutern diese Resultate folgendermaßen:

Blockierende Faktoren bewirken, daß die die Hautreaktion induzierenden Zellen in die Milz abwandern, so daß ein Defizit an Immunzellen am Ort der Tuberkulinreaktion entsteht. Dies hebt die besondere Funktion der Milz im Hinblick auf die Gegenregulation der DTH hervor. Möglicherweise wandern auch bei unseren Hühnern Immunzellen in die Milz ab, hervorgerufen durch die Wirkung des Fremdserums direkt bzw. indirekt durch freigesetztes Cortison. Dieser Aspekt bleibt in Frage gestellt.

Die relativ stärkere Abnahme der Hautreaktion nach der lokalen Serumverabreichung (kombiniert mit 100 μ g GT) könnte man damit interpretieren, daß die an den Ort der Tuberkulinisierung eingewanderten Zellen durch das Serum mehr oder weniger daran gehemmt werden, Effektorstoffe der zellvermittelten Immunität abzusondern, unabhängig von der Art des injizierten Serums. Mackaness (1978) stellte außerdem fest, daß blockierende Serumfaktoren bei der Maus nur bei einer intravenösen Verabreichung voll wirksam sind. Diesen Sachverhalt näher zu ergründen, verbot sich uns aufgrund der auftretenden anaphylaktoiden Reaktionen beim Huhn nach intravenöser Serumapplikation.

Neben dem Einfluß von Gesamtserum auf die Allergie vom verzögerten Typ überprüften wir auch den Effekt intramuskulärer IgG-Gaben auf die Hautreaktion nach Tuberkulinisierung. Man könnte annehmen, daß die blockierende Wirkung bei den immunologisch intakten Hühnern bzgl. der DTH 35 Tage nach Sensibilisierung eine Funktion der IgG-Fraktion darstellt, und die fehlende Gegenregulation in dem IgG-Mangel der dysgamma-globulinämischen Tiere begründet liegt. IgG könnte beispielsweise bei den Kontrolltieren eine stimulierende Wirkung auf Suppressorzellen ausüben und somit eine Gegenregulation einleiten. Dennert (1973) diskutierte bei Mäusen die hemmende Wirkung hochkonzentrierter IgG - AK und den stimulierenden Einfluß niederkonzentrierter IgG - AK. Dieses Ergebnis bestätigte sich bei den dysgamma-globulinämischen Hühnern nicht.

Die Applikation von 0,15 M NaCl - Lösung und von Eigen-serum (je 3,0 ml) führten zu keiner meßbaren Beeinflussung der Hautdicke, so daß ein injektionsbedingter Effekt auf die Hautreaktion ausgeschlossen werden konnte.

6.2. Einfluß des skin-reactive factors (SRF) auf die DTH

6.2.1. Besprechung der Methoden

Zur weiteren Charakterisierung der Allergie vom verzögerten Typ bei dysgammaglobulinämischen Hühnern untersuchten wir die lokal am Ort der Tuberkulinisierung ablaufenden Ereignisse im Hinblick auf eine freigegebene Effektorsubstanz der zellvermittelten Immunität.

Dazu isolierten wir, wie unter 3.1.2. beschrieben, sensibilisierte Leukozyten aus peripherem Blut (PBL). Wir inkubierten (5% CO₂, 39 °C) jeweils 1×10^7 Zellen 24 Stunden in 1 ml RPMI unter Zusatz von Glutamin , Gentamycin und 100 µg PPD zur Bildung des skin-reactive factors(SRF; (Vosmik et al., 1977)). Für eine optimale Leukozytenausbeute erwies sich eine Blutmenge von 5 ml und eine Langsamzentrifugation bei 70 g als günstig, nachdem das Blut zuvor zur Sedimentation der Erythrozyten und Thrombozyten 30 Minuten stehengelassen wurde. Die Isolierung der Zellen aus dem Leukozytensaum, erforderte große Vorsicht, damit nicht zusätzlich aufgenommene Erythrozyten das Ergebnis verfälschten. Wegen der Empfindlichkeit der Zellkulturen , mußten stets zelltoxische Einflüsse in Erwägung gezogen werden, vor allem im Hinblick auf den pH-Wert der verwendeten Medien. Auch Temperatur , Luftfeuchtigkeit , die sterile Handhabung der Geräte und der verwendeten Zusätze und die inhibitorischen Effekte der Zusätze stellten möglicherweise zelltoxische Einflüsse dar. Pick et al. (1965)

beschrieben z.B. den hemmenden Einfluß von Chloramphenicol, Actinomycin D und Puromycin; diese Antibiotika schieden somit für uns aus. Beim Auszählen der Leukozyten in der Neubauer Zählkammer wurde mit Hilfe der Zellanfärbung mit Acridinorange eine durchschnittliche Lebensfähigkeit der Zellen von 95 % festgestellt. Nach der Inkubation wurden die Zellen nochmals aufgewirbelt, damit der an den Zellen haftende Faktor sich löste und sich eine homogene Verteilung des skin-reactive factors einstellte. Nach der Zentrifugation (400 g, 5 min.) zur Sedimentation der Leukozyten wurde mit einer Tuberkulinspritze 0,1 ml des Überstandes in einen Kehllappen von nicht sensibilisierten Kontrolltieren injiziert. Der andere Kehllappen diente stets zur Kontrolle, nach Injektion von 0,1 ml Medium ohne Zusätze (in Vorversuchen mit Antigenzusatz bzw. mit Leukozyten ohne Antigenzusatz). Wir wählten für die Inkubation eine Antigenmenge von $100 \mu\text{gPPD} / \text{ml RPMI}$, um pro 0,1 ml Medium eine analoge Antigenkonzentration zu erhalten wie bei der Tuberkulinisierung der Leukozytenspenders. Vosmik et al., 1977) stellten fest, daß die sensibilisierten Leukozyten in vitro ebenso wie in vivo nach Antigenkontakt einen Faktor produzieren, der eine Schwellung des Kehllappens verursacht. Dieser Faktor ist auf nicht sensibilisierte Hühner übertragbar und ruft eine HDZ hervor, die histomorphologisch der Tuberkulinreaktion entspricht (Vosmik et al., 1977). In Vorversuchen stellte sich durch wiederholtes Messen der HDZ heraus, daß die Reaktion vier Stunden nach SRF-Applikation

ihr Maximum erreichte und nach 24 Stunden wieder völlig abgeklungen war. Somit legten wir zum Abmessen der Kehllappendicke die Zeit von vier Stunden nach SRF-Applikation fest. Während des Versuchsablaufs mußten nach jeder SRF-Injektion die Empfänger gewechselt werden, da sonst an beiden Kehllappen überschießende Hautreaktionen vom Soforttyp auftraten, was vermutlich auf einem Zweitkontakt mit dem verabreichten Medium beruhte.

6.2.2. Besprechung der Ergebnisse

Wir fragten uns, ob die aktivierten Leukozyten dysgammaglobulinämischer Hühner im Vergleich zu immunologisch intakten Kontrollhühnern am Reaktionsort eine Effektorsubstanz der zellvermittelten Immunität (SRF, skin-reactive factor) in erhöhtem Ausmaß bzw. mit stärkerer Wirkung abgeben.

Außerdem wollten wir in einer Verlaufsuntersuchung überprüfen, ob die Aktivität der zellvermittelten Immunität in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Sensibilisierung der Leukozytenspender mit Hilfe einer Mediatorsubstanz auf nicht sensibilisierte Empfänger übertragbar ist. Nach der Inkubation (24 Stunden) und der Applikation von 0,1 ml des Überstandes

in den Kehllappen immunologisch intakter Kontrolltiere, stellten wir ca. 10 min. bis 12 Stunden nach SRF-Injektion positive Hautreaktionen fest, mit einem Peak nach jeweils vier Stunden.

Aus den Tabellen 4, 5, 6, 7, 8 geht hervor, daß die Leukozyten sensibilisierter dysgammaglobulinämischer Hühner den SRF bilden, der auf nicht sensibilisierte Kontrolltiere passiv übertragbar ist und dabei Hautreaktionen hervorruft. In der Verlaufsuntersuchung zeigte sich, daß keine Gesetzmäßigkeit besteht zwischen der HDZ der Spender und der SRF-Empfänger im Hinblick auf den Zeitpunkt nach Sensibilisierung. 147 Tage nach Sensibilisierung ergab sich beim dysgammaglobulinämischen Spendertier eine Zunahme der HDZ von 335 % auf 516 %, bei den SRF-Empfängern hingegen eine Abnahme der HDZ von 164 % auf 63 % .

Bennett und Bloom (1968) fanden bei ihren Untersuchungen heraus, daß der Migrationsinhibitionsfaktor (MIF), in den Kehllappen von nicht sensibilisierten Kontrollhühnern appliziert, eine Hautreaktion hervorruft, die histologisch der Tuberkulinreaktion entspricht. Dieses Ergebnis ist auch von uns in Vorversuchen reproduziert worden. Daraus könnten wir schlußfolgern, daß der MIF in seiner Funktion unserem SRF gleichzusetzen ist. Somit kann dem SRF eine doppelte Funktion zugesprochen werden: Er ruft einerseits schon an sich eine Hautreaktion hervor, die andererseits noch verstärkt wird durch die Inhibition der an den Reaktionsort eingewanderten Makrophagen. Durch Fraktionierung des Überstandes identifizierten Bennett und Bloom den MIF als ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 67 000. Pick et al. (1969) identifizierten ihn mit Hilfe der Immunelektrophorese als ein Globulin.

Der kürzere Zeitverlauf der experimentell erzeugten Allergie vom verzögerten Typ mit Hilfe des aktiven Faktors erklärt sich mit der vorherigen 24-stündigen Inkubation der Zellkulturen. Der Begriff "Allergie vom verzögerten Typ" läßt sich daher nicht mit einer verzögerten Wanderung von Immunzellen erklären, sondern vielmehr mit dem zeitlichen Verlauf der Produktion und Freisetzung des SRF nach Antigen-Kontakt. Pick et al. (1969) stellten fest, daß der Faktor bei kürzerer Inkubationszeit nicht gebildet wird.

Andererseits muß auch in Erwägung gezogen werden, daß die lokal begrenzten Ereignisse der Tuberkulinreaktion nur teilweise vom MIF allein hervorgerufen werden, und daß von den Lymphozyten eine zusätzliche Substanz gebildet wird, die zusammen mit dem MIF in der gleichen Fraktion vorkommt. Diese Substanz bezeichneten die Autoren als SRF (Maillard et al., 1972). Wir könnten auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß die Lymphozyten zuerst den MIF produzieren, woraufhin die an den Reaktionsort eingewanderten Makrophagen in ihrer Abwanderung inhibiert und gleichzeitig stimuliert werden, den SRF abzugeben.

Den zeitlichen Verlauf passiv übertragener Tuberkulinreaktionen analysierten Maillard et al. (1972) näher vor allem in Bezug auf die Gefäßpermeabilität mit Hilfe von Evans Blau:

1. Die vermehrte Gefäßdurchlässigkeit während der ersten 20 Minuten ist unspezifisch, da sie auch aufgrund einer spontanen Freisetzung von Proteasen von Lymphozytenüberständen hervorgerufen wird ohne vorherige Antigen- bzw. Mitogenzusätze. Bei einer Zunahme der toten Zellen vergrößerte sich die Permeabilität der Gefäße. Dies ist vermutlich auf freiwerdende Zellzerfallsprodukte zurückzuführen.
2. Die zweite Phase (20 min. - 4 std. nach Injektion) setzte sich aus der SRF-Produktion durch sensibilisierte Lymphozyten und durch nicht sensibilisierte Makrophagen zusammen. Diese Phase erforderte lebende Zellkulturen. Nach zu langer Inkubation der Zellkulturen traten abgeschwächte Hautreaktionen auf, was möglicherweise auf zerfallenen Makrophagen und den damit freigegebenen lysosomalen Enzymen beruhte.

Diese nähere Charakterisierung gelang den Autoren aufgrund einer Zellseparation vor Inkubation.

Pick et al. (1969) beschrieben, daß die Makrophagen auf das Antigen hin mit der Bildung einer Erythem induzierenden Substanz antworteten, die nicht zur Induration beiträgt, während die Lymphozyten auf das Antigen hin erythem- und indurationsinduzierende Faktoren freigeben. Es wäre auch denkbar, daß der SRF nur ein indirekter Mediator ist, der eine zweite Substanz aktiviert, mit der er schließlich einen hautreaktiven Komplex bildet.

6.3. Die wechselseitige Übertragung von Leukozyten normogammaglobulinämischer auf dysgammaglobulinämische und dysgammaglobulinämischer auf normogammaglobulinämische Hühner

6.3.1. Besprechung der Methoden

Wir isolierten Leukozyten aus peripherem Blut wie unter 3.1.2. beschrieben. Als Leukozytenspender dienten normogammaglobulinämische und dysgammaglobulinämische Hühner. In der Neubauer Zählkammer beurteilten wir die Zellen mit Hilfe von Acridinorange hinsichtlich ihrer Lebensfähigkeit und stellten eine Zellzahl von 1×10^7 Leukozyten / ml PBS (phosphate buffered saline) ein. Den ersten Zelltransfer führten wir acht Wochen nach Sensibilisierung der Hühner durch, einem Zeitpunkt, zu dem bei den immunologisch intakten Kontrolltieren eine deutliche Gegenregulation eingetreten war, und somit die spekulativ angenommenen Suppressorzellen bzw. Helferzellen bei den Versuchstieren in der Leukozytenpopulation vorkommen müßten.

Acht Wochen nach Sensibilisierung übertrugen wir isolierte Leukozyten zwischen zwei dysgammaglobulinämischen und zwei normogammaglobulinämischen Hühnern, um injektionsbedingte Einflüsse ausschließen zu können. Eine Woche danach überprüften wir die Hautdickenzunahme hinsichtlich einer Veränderung. Zehn Wochen nach Sensibilisierung führten wir einen wechselseitigen Zelltransfer von 1×10^7 Leukozyten durch, zwischen je einem dys- und einem normogammaglobulinämischen Huhn, und testeten die HDZ im Vergleich zu den Werten, die eine Woche vor und eine Woche nach dem Zell-

transfer gemessen wurden. Die Tuberkulinisierung führten wir stets 24 Stunden nach dem Zelltransfer durch. Wir wählten beim wechselseitigen Zelltransfer jeweils nur ein Tier, da wir dabei weniger Blut für die Leukozytengewinnung benötigten und somit der Allgemeinzustand der Spendertiere weniger beeinträchtigt wurde. Zudem hatten wir bei der Leukozytenübertragung von Tier zu Tier eine bessere Vergleichsmöglichkeit hinsichtlich des Suppressor- bzw. Helfereffektes, da die Einzeltiere jeweils unterschiedlich starke Hautreaktionen aufwiesen. Letztlich addierten wir auch die entsprechenden Hautdickenzunahmen der Einzeltiere jeweils in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Sensibilisierung und stellten deren Mittelwerte tabellarisch und graphisch dar (Tab. 9, 10 und Figur 3).

6.3.2. Besprechung der Ergebnisse

Wir wollten mit Hilfe des Leukozytentransfers klären, ob die fehlende Gegenregulation bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern auf einem Defekt von Suppressorzellen bzw. einer fehlenden supprimierenden Leukozyteninteraktion beruht oder ob Helferzellen in verstärktem Ausmaß in die B - T - Zellinteraktion eingreifen. Dabei stellten wir fest, daß sowohl der Leukozytentransfer zwischen dysgammaglobulinämischen als auch der Leukozytentransfer zwischen normogammaglobulinämischen Hühnern keinen Einfluß auf die Hautreaktion hatten, ebenso wenig wie die Übertragung von Leukozyten dysgammaglobulinämischer Hühner auf normogammaglobulinämische Hühner. Die allgemein abnehmende Tendenz der

Tuberkulinreaktion nach Transfer dysgammaglobulinämischer Zellen auf normogammaglobulinämische Hühner entspricht aber den bisherigen Vorstellungen der Gegenregulation der DTH ab der vierten Sensibilisierungswoche. Die prolongierte HDZ bei dysgammaglobulinämischen Hühnern beruht demnach nicht auf einem übermäßigen Helfereffekt. Nach dem Transfer von Leukozyten normogammaglobulinämischer Tiere auf dysgammaglobulinämische Tiere ergab sich beim Vergleich der Mittelwerte vor und nach Zelltransfer ein signifikant niedrigerer Wert ($p < 0,05$), der auch noch eine Woche nach dem Zelltransfer erhalten blieb. Diese Ergebnisse geben Anlaß dazu, in der übertragenen Leukozytenpopulation eine supprimierende Leukozyteninteraktion bzw. eine Suppressorzelle zu vermuten. Unterstrichen wird diese Feststellung noch dadurch, daß die dysgammaglobulinämischen Hühner, bei denen kein Zelltransfer durchgeführt wurde, keine Suppressionen zeigten

Neta und Salvin (1976) führten die Suppression bei Meerschweinchen auf B- und T-Suppressorzellen zurück, die in erhöhter Konzentration in Thymus und Milz zu finden waren. Sie vertraten außerdem die Ansicht, daß für die Regulation der Immunsuppression alle grundlegenden Elemente des Immunsystems eingeschlossen sind, vor allem B- und T-Lymphozyten und Makrophagen.

Jede Zellart spiele eine gewisse Rolle in Abhängigkeit von der jeweiligen immunologischen Umgebung. Wick (1979) eröffnet die interessante Möglichkeit, daß die T-Suppressorzellen den T-Killerzellen identisch sein könnten. Er beschreibt eine Zellkooperation als Grundvoraussetzung für eine Immunsuppression am Modell:

- 1a) Eine T-Zelle synthetisiert ein Produkt, IgT, und wirkt so direkt auf B-Zellen, wobei das Signal für B-Zellaktivierung

nur von der Menge des IgT abhinge.

- 1b) Oder, daß das T-Zellprodukt (IgT) - wie auch Feldmann (1972) postulierte - nur dann stimulierend wirke, wenn es den B-Zellen von Makrophagen präsentiert werde. Ohne diesen Umweg wirke es suppressiv.
- 1c) Es könnte nur das von Makrophagen gebundene IgT, wie unter 1b) angegeben, die B-Zellen beeinflussen, und andere Klassen von T-Zellen würden in dem Prozeß modifiziert eingreifen.
- 2) Es wäre auch denkbar, daß ein und dieselbe T-Zelle nach Stimulierung über einen Antigenrezeptor zwei verschiedene Produkte, ein stimulatorisches und ein supprimierendes, bildet.
- 3) Es könnten zwei Arten von T-Zellrezeptoren vorhanden sein, wobei einer verantwortlich wäre für die Auslösung kooperativer Aktivitäten, der andere für die Fähigkeit zur Suppression.
- 4) Als vierte Möglichkeit zieht Wick (1979) zwei Zellarten in Betracht, mit je einer Art von Rezeptoren, wovon eine als Helferzelle, die andere als Suppressorzelle fungiert.

Moretta et al. (1977) haben Fc-Rezeptoren positive T-Zellsubpopulationen aus dem peripheren menschlichen Blut isoliert und funktionell getestet. Dabei zeigte sich, daß Fc-positive Zellen, die Rezeptoren für IgM besitzen, in einem in vitro System als Helferzellen für B-Zellen fungieren, während T-Zellen mit Rezeptoren für IgG dies nicht konnten, sondern immunsuppressiv wirkten. Diese Vorstellung könnte auch bei unseren dysgammaglobulinämischen Hühnern zutreffen: sie könnten beispielsweise überwiegend IgM-Rezeptoren an T-Zellen und somit einen verstärkten T-Zell-Helfereffekt aufweisen. Aufgrund unserer Versuche (siehe Tab. 9, 10; Fig. 3) ist diese Version jedoch auszuschließen.

Neta und Salvin (1976) schreiben hingegen die Suppression primär einer B-Suppressorzelle zu, die möglicherweise die Aktivität einer T-Zelle reguliert.

Moticka et al. (1977) berichten auch von einem Synergismus zwischen T- und B-Zellen. Dieses stellten sie mit Leukozytenmischungen unterschiedlicher Konzentrationen fest. Eine niedrige Menge an Thymuszellen unter Zusatz einer suboptimalen Anzahl von Milzzellen führte zu einer verstärkten Immunantwort, während eine geringe Anzahl an Thymuszellen (1×10^5) mit einer optimalen Anzahl von Milzlymphozyten zu einer eindeutigen Immunsuppression führten. Im Hinblick darauf könnten wir bei dysgammaglobulinämischen Tieren einen Milz- bzw./ und Thymusdefekt in Erwägung ziehen. Sie berichten außerdem, daß die Suppressorzellen vermutlich B-Zellen darstellen, die in den Thymus gewandert sind, da bei bursektomierten Tieren diese Suppressorzellen im Thymus fehlen. Das würde bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern einen (alleinigen) Bursadefekt in Frage stellen.

Binz (1979) erläutert die Suppression via antigenspezifischer Faktoren (Suppressorfaktoren). Diese Faktoren inaktivieren irreversibel und selektiv die Helferzellen, die damit die Fähigkeit verlieren, den entsprechenden T- und B-Zellen zu helfen.

Wecker und Schimpl (1979) schreiben löslichen Mediatorstoffen eine wesentliche Rolle bei der positiven und negativen Regulation von Immunreaktionen zu. In Mäuseversuchen stellten sie fest, daß nach antigener Stimulierung T-Helferzellen einen T-zellersetzenden Faktor (TRF) produzieren. Dieser gibt Ag-aktivierten B-Lymphozyten das Signal, mit der AK-Synthese zu beginnen. Bei der negativen Regulation des Immunsystems scheinen Mediatoren, nämlich antigenspezifische und antigenunspezifische Suppressor-

faktoren, beteiligt zu sein. Eine Subklasse von Suppressor-T-Zellen produziert einen Ag-spezifischen Faktor, TSF. Er wirkt auf eine andere Subpopulation von T-Zellen, welche nun einen zweiten, diesmal Ag-unspezifischen Suppressorfaktor produzieren. Auch dieser ist jedoch nicht direkt gegen AK-produzierende B-Zellen gerichtet. Er verhindert vielmehr die Funktion von T-Helferzellen. Dadurch kommt es dann zur Hemmung weiterer AK-Produktion. Ähnliche Verhältnisse scheinen auch bei der zellvermittelten Immunreaktion vorzuliegen, wobei eine T-Helferzelle der teilungsaktivierten Präkillerzelle mittels eines löslichen Faktors das Signal gibt, sich zur eigentlichen zytotoxischen Effektorzelle zu differenzieren. Dieser als killerzellassistierende Faktor bezeichnete Mediatorstoff hat große biochemische Ähnlichkeit mit dem TRF, der als Differenzierungshormon betrachtet wird, durch welches ein sich teilender Lymphozyt zu einer AK-produzierenden Zelle wird, deren Endzustand die nicht mehr teilungsfähige Plasmazelle ist. Die Bildung des Faktors wird genetisch kontrolliert.

Rückblickend auf die den dysgammaglobulinämischen Tieren fehlende zelluläre Immunsuppression, könnten wir hauptsächlich folgende Erwägungen als Ursache in Betracht ziehen:

1. B-Suppressorzellen sind überhaupt nicht oder in zu geringer Anzahl vorhanden.
2. B-Suppressorzellen bedürfen T-Helferzellen, die nicht vorhanden sind.
3. B-Suppressorzellen brauchen den TRF, der nicht produziert wird.
4. TSF wird nicht produziert.
5. TRF und TSF benötigen, um wirksam zu werden, Makrophagen, die bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern evtl. nicht voll funktionstüchtig sind.
6. Die prolongierte Hautreaktion bei den dysgammaglobulinämischen Tieren könnte auf eine fehlende T-Suppressorzelle zurückzuführen sein bzw. eine fehlende B- und T-Suppressorzelle.
7. Die Lymphozyten produzieren bei Kontrolltieren nach Antigenkontakt Substanzen, die Makrophagen so stimulieren, daß sie inhibitorisch wirken (Blomgren et al., 1979). Diesbezüglich könnte bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern ein Defekt vorliegen.
8. Ein Milz- bzw. / und Thymusdefekt könnte in Frage kommen, da die Suppressorzellen von verschiedenen Autoren (Neta und Salvin, 1976) in den erwähnten Organen in erhöhter Konzentration aufgefunden wurden.

6.4. Effekt der Tuberkulinisierung auf sensibilisierte,
chemisch "bursektomierte" Hühner

6.4.1. Besprechung der Methoden

Die Funktion der Bursa Fabricii kann durch verschiedene Methoden ganz oder teilweise eliminiert werden:

- a) chirurgisch (vom dritten Bruttag an)
- b) hormonell mit Hilfe von Testosteronpropionat (TP)
entweder durch Injektion oder durch Eintauchen des
angebrüteten Eies in eine alkoholische TP-Lösung
vom 3. - 14. Bruttag

- c) chemisch mit Hilfe von CY durch Injektion in der
Regel an den ersten drei bis vier Lebenstagen.

Sowohl die Methoden a) und c) als auch b) und c)
können kombiniert angewandt werden.

Die kombinierte Anwendung zweier Methoden führt in
der Regel zur permanenten Agammaglobulinämie, wobei
die Kombination b) und c) besonders wirkungsvoll ist.
Im Gegensatz dazu führt die alleinige Anwendung von TP,
das offensichtlich die epitheliale Bursa-Anlage zerstört
(Fiedler, Löscher, Herlyn, Hoffmann-Fezer, 1977), zu einer
Aufspaltung bzgl. des späteren Immunglobulinmusters:
Es ergeben sich sowohl Normo- als auch Dys- als auch
Hypogammaglobulinämien.

CY führt, abhängig von der Dosis, zu Bursafunktionsstörungen
von zeitlich unterschiedlicher Dauer (Fiedler et al., 1977;
zusammenfassend Löscher, 1978).

Hohe CY-Dosen (4 x 3 mg / Küken) führen zur Eliminierung auch aller in der Peripherie befindlichen B-Zellen und zu einer zeitweiligen Affizierung des Thymusgewebes und der Thymusfunktion (Linna et al., 1972). Thymusgewebe und Thymusfunktion erholen sich im Gegensatz zu den B-Zellfunktionen vollständig. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu bemerken, daß die Behandlung mit den obengenannten CY-Dosen zu außerordentlich hohen Mortalitätsraten führt (Toivanen, 1974).

Die chirurgische Bursektomie entfiel als zu wählende Methode, weil die von Fitzsimmons (1973) beschriebene Bursektomie innerhalb der ersten 72 Lebensstunden nicht durchführbar erschien und bei Bursektomien zu späteren Zeitpunkten (16. Embryonaltag bis Tag des Schlupfes) nie die Gewähr bestand, daß nicht schon von der Bursa Zellen in die Peripherie gewandert waren.

Dysgammaglobulinämien nach TP-Verabreichung sind so zu erklären, daß Stammzellen, die kein Bursaenvironment vorfinden, extra-bursal ausreifen können, dabei aber nie zu IgG-produzierenden Zellen differenzieren können.

Somit hofften wir, zwei Modelle herstellen zu können:

- zum einen total B-zelldepletierte Hühner, die also auch von möglichen B-Suppressorzellen vollkommen depletiert wären (agammaglobulinämische Hühner)
- zum anderen dysgammaglobulinämische Hühner, deren B-Zellen keine Bursa-Reifung durchgemacht haben.

6.4.2. Besprechung der Ergebnisse

Während die Produktion agammaglobulinämischer Küken zur vollen Zufriedenheit erreicht wurde ($\text{IgG} < 0,3 \text{ mg/dl}$; $\text{IgM} < 0,5 \text{ mg/dl}$; $\text{IgA} < 0,5 \%$ der Norm), gelang es weder mit 2,0 %iger noch mit 2,5 %iger TP-Lösung, permanente Dysgammaglobulinämien zu erzeugen (nur 4 von 30 behandelten Küken zeigten dieses Ig-Muster). Die Behandlung mit einer 3,0 %igen TP-Lösung, die in früheren Untersuchungen zu mehr als 30 % permanenten Dysgammaglobulinämien führte (Kobosil, 1973), erwies sich in Voruntersuchungen als letal (Mortalität $> 90 \%$). Somit konnten nur die Ergebnisse der experimentell agammaglobulinämisch gemachten Küken zur Darstellung kommen (Fig. 4, Tab. 12). Aus den Ergebnissen geht hervor, daß die HDZ ähnlich wie bei den von Scheu (1978) und Fiedler et al. (1980) beschriebenen erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern sowohl intensiviert als auch prolongiert war; allerdings trat um die neunte Woche nach Sensibilisierung eine Abnahme der Hautdickenzunahme auf (Tab. 4), während die erblich dysgammaglobulinämischen B12-Küken noch nach 11 Wochen den maximalen Fünf-Wochenwert aufwiesen. Bei mit CY und TP behandelten Tieren ist das B-Zellsystem total eliminiert. Da bei diesen Tieren eine, wenn auch verspätete, Wiederabnahme der HDZ auftritt, kann die fehlende Gegenregulation bei den dysgammaglobulinämischen B12-Tieren nicht ausschließlich auf einen B-Zelldefekt zurückzuführen sein.

Es ist naheliegend, daß ein Mangel an T-Suppressorfunktionen mit im Spiel ist. Die verstärkte DTH- Reaktion bei den experimentell agammaglobulinämischen Küken und insbesondere die hochgradige Verzögerung der Gegenregulation lassen jedoch eine Beteiligung des B-Zellsystems keineswegs unmöglich erscheinen.

Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß die erhöht- Serum-IgM-Konzentration stimulierend auf die DTH bei den erblich dysgammaglobulinämischen Hühnern wirkt und somit für die Prolongierung mitverantwortlich ist (Dennert, 1973). Dies war der Grund, weshalb versucht wurde, eine dysgammaglobulinämische Kükengruppe experimentell zu erzeugen. Aus den oben angegebenen Gründen konnte aber die Einwirkung einer einseitig erhöhten IgM-Serumkonzentration nicht überprüft werden. Dennert (1973) diskutierte den stimulierenden Effekt von IgM-Antikörpern auf die Immunantwort unter der Bedingung, daß IgM mindestens drei Tage vor Ag-Gabe verabreicht wurde. IgM stimulierte hingegen nicht, wenn es zwei Stunden nach Ag-Zufuhr appliziert wurde. Es wäre folglich denkbar, daß das IgM mit dem Ag einen die Immunantwort stimulierenden Komplex bildet.

7. Zusammenfassung

Wir wollten die Ursache der den dysgammaglobulinämischen Hühnern fehlenden Gegenregulation bei der Allergie vom verzögerten Typ (=DTH) näher analysieren. Dabei standen folgende Fragenkomplexe zur Diskussion:

1. Die Beteiligung von immunsuppressiv wirkenden Serumproteinen.
2. Der Effekt eines lokal, am Ort der Tuberkulinisierung von den Lymphozyten produzierten hautreaktiven Faktors (SRF, skin-reactive factor).
3. Der Einfluß einer supprimierenden Leukozyteninteraktion.
4. Die vergleichende Überprüfung der Hautreaktion zwischen experimentell agammaglobulinämisch gemachten und genuin dysgammaglobulinämischen Hühnern

Dabei konnten folgende Resultate festgestellt werden:

1. Die i.c. und i.m. Applikation von Serum dysgammaglobulinämischer und normogammaglobulinämischer Hühner erbrachte keinen gesetzmäßigen Einfluß auf die Allergie vom verzögerten Typ. Die resultierende abnehmende Tendenz der HDZ (= Hautdickenzunahme) erklärt sich vermutlich aus einer immunsuppressiv wirkenden Cortisonfreisetzung (Folch et al., 1974).
IgG beeinflusst die Immunreaktionen nicht.
2. Eine Leukozytenpopulation dysgammaglobulinämischer Hühner produzierte den hautreaktiven Faktor, SRF (skin-reactive factor). Eine wirksame Aktivität im Hinblick auf die

Gegenregulation läßt sich jedoch aufgrund der Ergebnisse ausschließen.

3. Aus dem Transfer von Leukozyten normogammaglobulinämischer auf dysgammaglobulinämische Hühner ergab sich eine immunsuppressive Wirkung, während die Leukozyten dysgammaglobulinämischer auf normogammaglobulinämische Hühner keinen die Hautreaktion verstärkenden Einfluß zeigten. Damit könnten wir die Gegenregulation der Kontrollhühner bezüglich der DTH mit einer immunsuppressiven Leukozytenpopulation erklären, die den dysgammaglobulinämischen Hühnern fehlt.
4. Um diese Leukozytenpopulation näher zu definieren, schalteten wir das B-Zellimmunsystem experimentell aus und überprüften die Hautreaktion nach Tuberkulinisierung im Rahmen einer Verlaufsuntersuchung. Die experimentell agammaglobulinämischen Tiere lagen bzgl. der Stärke der Hautreaktion zwischen den genuin dysgammaglobulinämischen und den immunologisch intakten Kontrolltieren. Da bei den agammaglobulinämischen Hühnern eine Gegenregulation auftrat, läßt sich das B-Zellsystem als primäre Ursache der Gegenregulation ausschließen. Folglich ist die prolongierte und verstärkte Hautreaktion bei den dysgammaglobulinämischen Hühnern vermutlich auf einen T-Zell-Defekt, möglicherweise auf fehlende T-Suppressorzellen, zurückzuführen. Dabei ist jedoch aufgrund der stark verzögert einsetzenden Gegenregulation bei den agammaglobulinämischen Hühnern im Vergleich zu den Kontrollhühnern eine Mitbeteiligung des B-Zellsystems und von stimulierenden IgM-Antikörpern in Erwägung zu ziehen.

8. Summary

The main purpose of this enquiry was to analyze the counter-regulation of delayed type hypersensitivity, which the dysgammaglobulinemic chicken are lacking. This led to a number of interrelated problem-aspects:

1. The impact of immunesuppressive protein in serum
2. The effect of a skin-reactive factor (SRF) produced locally by the lymphocytes
3. The influence of immunesuppressive interaction between leucocytes
4. The skin-reaction of experimentally produced agammaglobulinemic chicken compared to the skin-reaction of genuinely dysgammaglobulinemic chicken.

The following results could be ascertained:

1. The i.c. (intracutane) and i.m. (intramuscular) application of serum of dysgammaglobulinemic and of normogammaglobulinemic chicken did not have any regular influence on delayed type hypersensitivity. The decrease of skin-thickness could well be the result of an immunesuppressive cortison production (Folch et al., 1974).
IgG does not influence immune response.
2. A leucocyte population of dysgammaglobulinemic chicken produced the skin-reactive factor (SRF). Any effective activity concerning counter-regulation can safely be excluded, however.

3. The effect of leucocyte transfer of normogammaglobulinemic chicken upon dysgammaglobulinemic ones was immunosuppressive, whereas the leucocytes of dysgammaglobulinemic chicken did not intensify the skin-reaction of normogammaglobulinemic ones. Thus the counter-regulation of the control-chicken can be explained as an immunosuppressive leucocyte population, which is absent in dysgammaglobulinemic chicken.
4. In order to define this leucocyte population more precisely, the B-cell immune system was eliminated experimentally and the skin-reactions were tested repeatedly after tuberculinization. The skin-reaction of the experimentally agammaglobulinemic animals achieved a middle position between the genuinely dysgammaglobulinemic and the immunologically intact control chicken. Because of the greatly delayed counter-regulation it seems reasonable to assume that the prolonged and stimulated skin-reaction of the dysgammaglobulinemic chicken is primarily caused by a T-cell defect, possibly by missing T-suppressor cells, and that stimulating IgM antibody may well co-influence that process.

9. Literaturverzeichnis

Askonas, B.A., Rodants, G.:

Macrophages bearing hapten-carrier molecules as foci
inducers for T and B lymphocytes interaction

Europ. J. Immunol. 1, 4 (1974)

Ashershon, G.L., Zembala, M., Nowokolsky:

The purification of specific antipicryl T suppressor
factor which suppresses the passive transfer of
contact sensitivity: affinity chromatography on
antigen and Concanavalin A sepharon and specific
elution with hapten and methylmannosid

Immunology 35, 1051 (1978)

Bohner, J.:

BHW und Umsatz von IgG normaler und dysgamma-
globulinämischer Haushühner

Diss. München 1977

Bennett, B., Bloom, B.:

Reactions in vivo and in vitro produced by a soluble
substance associated with DTH

Pathology 59, 757 (1968)

Binz, H.:

Membranrezeptoren lymphatischer Zellen in der Infor-
mationsübermittlung antigener Reize

Verhandlung der Gesellschaft Dt. Naturforscher und
Ärzte, S. 107 (1979)

Klin. Wochschr. 57, 625

Blomgren, H., Larsson, E.:

Evidence that soluble products released by PHA-stimulated human lymphoid cells activate immune-suppressive monocytes

Scand. J. Immunol. 2, 53-60 (1979)

Bier, O.G., Götze, D., Mota, J., Dias da Silva, W.:

Experimentelle und klinische Immunologie

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1979

Cantor, H., Asofsky, R.:

Synergy among lymphoid cells mediating the graft - versus - host response. III. Evidence for interaction between two classes of thymus-derived cells

J. Exp. Med. 135, 764 (1971)

Clamann, H.N., Chaperon, E.A.:

Immunologic complementation between thymus and marrow cells. A model for the two-cell theory of immunocompetence

Transpl. Rev. 1, 92 (1969)

Dennert, G.:

Effects of IgM on the in vivo and in vitro immune response

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, 889 (1973)

Dennert, G.:

Effector mechanisms of cell-mediated immunity to
xenogenic cell antigens

J. Immunol. 113, 201 (1974)

Feldmann, M.:

Cell interactions in the immune response in vitro

J. Exp. Med. 136, 737 (1972)

Feldmann, M., Basten, A.:

Cell interactions in the immune response in vitro IV.
Comparison of the effects of antigen-specific and
allogenic thymus-derived cell factors

J. Exp. Med. 136, 722 (1972)

Fiedler, H., Lösch, U., Hála,

Establishment of a B-compatible chicken line normo-
gammaglobulinemia and dysgammaglobulinemia

Folia biologica, Prag (in Vorbereitung)

Fiedler, H., Lösch, U., Herlyn, D., Hoffmann-Fezer, G.:

Die Auswirkungen neonataler Cyclophosphamidverabreichung,
chirurgischer Bursektomie und kombinierter Behandlung auf
die immunologische Leistungsfähigkeit von Küken in ver-
schiedenen Altersstufen

Zbl. Vet. Med. B, 24, 609-622 (1977)

Fitzsimmons, R.C., Garrod, E.M.F., Garnett, L.:

Immunological responses following early embryonic
surgical bursectomy

Cellular Immunology 2, 3, 377-383 (1973)

Folch, H., Waksman, B.:

The splenic suppressor cell

J. Immunol. 113, 1. (1974)

Fox, R.A., Gregory, D.S., Feldmann, J.D.:

Macrophage receptors for migration inhibitory
factor (MIF), migrating stimulatory factor (MSF)
and agglutinating factor

J. Immunol. 112, 1867 (1974)

Frei, W.:

Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende
der Tiermedizin

Paul Parey Verlag, Berlin, Hamburg, 1972

Gershon, R.K., Cohen, P., Hencin, R., Liebhaver, S.A.:

Suppressor T cells

J. Immunol. 108, 586 (1972)

Glick, B., Sato, K.:

Anaphylactoid response induced by a single injection
of the Bursa of Fabricius

Poultry Sci. 44, 6 (1965)

Glick, B., Chang, T.S., Jaap, R.G.:

The Bursa of Fabricius and antibody production
Poultry Sci. 35, 224 (1956)

Glick, B., Sadler, C.R.:

The elimination of the Bursa of Fabricius and reduction
of antibody production in birds from eggs dipped in
hormone solution
Poultry Sci. 40, 185 (1961)

Graf, M.W., Uhr, J.W.:

Regulation of antibody formation by serum antibody I.
Removal of specific antibody by means of immuno-
adsorption
J. Exp. Med. 130, 1175 (1969)

Greaves, M.F., Owen, J.J.T., Raff, M.C.:

T and B lymphocytes
Excerpta Medica, Amsterdam (1974)
Am. Elsevier Publ. Co., Inc. N.Y.

Herlyn, D., Lösch, U., Böhner, J.:

IgG Turnover in dysgammaglobulinemic chickens
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 358, 1169-1172 (1977)

Herzenberg, L.A., Chang, E.L., Ravitch, M.M., Riblet, R.J.:

Active suppression of immunoglobulin allotype synthesis
III. Identification of T cells as responsible for
suppression by cells from spleen, thymus, lymphnode,
and bone marrow

J. Exp. Med. 137, 1311 (1973)

Hoffmann-Fezer, G., Fiedler, H., Starker, H., Löscher, U.:

Histologische Veränderungen in den lymphatischen
Organen von neonatal mit CY behandelten, chirurgisch
burssektomierten und kombiniert behandelten Küken

Zbl. Vet. Med. B 24, 636-647 (1977)

Huber, H., Rolley, M.J., Linscott, W.D., Fudenberg, H.N.,
Müller-Eberhard, H.J.:

Human monocytes: distinct receptor sites for the third
component of complement and for immunoglobulin G

Science 162, 1281 (1968)

Jenner, E.:

An inquiry into the causes and effects of the
Variolae Vaccinae

London 1798, p. 13

Koch, R.:

Fortsetzung der Mitteilungen über ein Heilmittel
gegen Tuberkulose

Dtsch. med. Wochschr. 17, 1189 (1891)

Kirchner, H., Oppenheim, J.J., Blaese, M.R., Hofstrand, H.J.:

Defective in vitro spleen cell proliferative response
to Ag in agammaglobulinemic chickens

J. Immunol. 103, 2 (1972)

Kobosil, K.:

Versuche zur Wiederherstellung der humoralen Reaktions-
fähigkeit immunologisch defekter Hühner

Diss. München, 1973

Linna, T.T., Frommel, D., Good, R.A.:

Effects of early CY treatment on the development of
lymphoid organs and immunological functions in the
chickens

Int. Arch. Allergy 42, 20-39 (1972)

Lösch, U., Klumpner, W., Kühlmann-Rabens, I., Fiedler, H.:

Course of Serum-Ig concentration in B 12 chicken line
(in Vorbereitung)

Lösch, U.:

Die experimentelle Beeinflussung des Immunsystems beim
Huhn

Symp. d. Dt. Vet.med. Ges., S. 14 (1978)

Lösch, U.:

Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie

Habilitationsschrift, München, 1972

Mackaness, G.B., Lagrange, H., Miller, T.F.,
Ishibashi, T.:

Feedback inhibition of specifically sensitized
lymphocytes

J. Exp. Med. 133, 543 (1974)

Mackaness, G.B., Lagrange, H.:

Site of action of serum factors that block delayed
type hypersensitivity in mice

J. Exp. Med. 147, 235-245 (1978)

Maillard, J.L., Pick, E., Turk, J.L.:

Interaction between sensitized lymphocytes and
antigen in vitro

Int. Arch. Allergy 42, 50-68 (1972)

Miller, J.F.A.P., Mitchell, G.P.:

Cell to cell interaction in the immune response.
Haemolysin forming cells in the neonatally
thymectomized mice reconstituted with thymus or
thoracic duct lymphocytes

J. Exp. Med. 128, 801 (1968)

Miller, J.F.A.P.:

Immunological function of the thymus

The Lancett (II), 748 (1961)

Miller, J.F.A.P., Mitchell, G.F.:

Thymus and antigen reactive cells

Transpl. Rev. 1, 3 (1969)

Mitchison, A.:

The carrier effect in the secondary response to
hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation

Eur. J. Immunol. 1, 18 (1971)

Moretta, L., Webb, S.R., Gross, C.E., Lydyard, P.M.,
Cooper, M.D.:

Functional analysis of two human T-cell subpopulations.
Helo and suppression of B-cell responses by T-cells

J. Exp. Med. 146, 184 (1977)

Moticka, E.J.:

Regulatory lymphocytes in T-cell functions in chickens,
in: Avian Immunology 88, 187 (1977)

Ed.: A.A. Benedict, Plenum Press, New York, London

Neta, R., Salvin, S.B.:

T- and B- lymphocytes in the regulation of DTH

J. Immunol. 117, 2014 (1976)

Neta, R., Salvin, S.D.:

Specific suppression of DTH. The possible presence
of a suppressor cell in the regulation of DTH

J.Immunol. 113, 1716 (1974)

Pick, E., Krejci, J., Cech, K., Turk, J.L.:

Interaction between "sensitized lymphocytes" and
Ag in vitro

Immunology 17, 741 (1969)

Pincus, C.S., Nussenzweig, V.:

Passive antibody may simultaneously suppress and
stimulate antibody formation against different
portions of a protein molecule

Nature 222, 594 (1969)

Rhodes, J.:

Receptor for monomeric IgM on guinea-pig splenic
macrophages

Nature 243, 527 (1972)

Rolle, M., Mayr, A.:

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für
Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1978

Sachs, L.:

Statistische Methoden

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1976

Scheidegger, J.J.:

Une micro-methode de l'immune-electrophorese

Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

Scheu, M.:

Zur weiteren Charakterisierung einer Dysgamma-
globulinämie beim Huhn und einer möglichen T-Zell-
regulation durch B-Zellen am Vorgang der Allergie
vom verzögerten Typ

Diss., München, 1978

Schrader, J.W., Feldmann, M.:

The mechanisms of antigen competition I.
The macrophage as a site of reversible block
of T-B-lymphocytes collaboration

Europ. J. Immunol. 3, 711 (1973)

Sörén, I., Maller, R.:

Restimulation of PPD-stimulated lymphocytes decreased responsiveness of prestimulated cells to a second challenge with PPD and PHA

Scand. J. Immunol. 2, 1-7 (1975)

Steinmann, R.M., Cohen, Z.A.:

The interaction of particulate horse-radish peroxidase (HRP) - Anti HRP immune complexes with mouse peritoneal macrophages in vitro

Cell Biol. 55, 616 (1972)

Toivanen, P., Eskola, J.:

Effect of in ovo treatment with Cyclophosphamide on lymphoid system in chicken

Cellular Immunology 13, 459-471 (1974)

Turk, J.L., Parker, D.:

Further studies on B-lymphocytes suppression in DTH, indicating a possible mechanism for Jones Mote Hypersensitivity

Immunology 24, 751 (1973)

Uhr, J.W.:

Passive sensitization of lymphocytes and macrophages by antigen - antibody complexes

Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 54, 1599 (1965)

Uhr, J.W., Salvin, S.B., Pappenheimer, A.M.:

Delayed hypersensitivity II. Induction of hypersensitivity in guinea-pigs by means of antigen-antibody complexes

J. Exp. Med. 105, 11 (1957)

Vosmik, F., Krejčí, J., Karakoz, I., Hraba, T., Pekárek, Hálal, K.:

Histology of the inflammatory reaction produced by a skin-reactive factor in the wattles of inbred chickens

Folia biologica (Prag) 23, (1977)

Warner, N.L.; Ovary, Z., Kantor, F.S.:

Delayed hypersensitivity reactions in normal and bursectomized chickens

Int. Arch. Allergy 40, 719-728 (1971)

Warner, N.L.:

The immunological role of the avian thymus and Bursa of Fabricius

Folia biologica 13, 1 (1967)

Wecker, E., Schimpl, A.:

Membranrezeptoren lymphatischer Zellen in der Informationsübermittlung antigener Reize

Verhandlung der Gesellschaft Dt. Naturforscher und Ärzte

Klin. Wochschr. 57, 631 (1979)

Weidanz, W.P., Weber, W.T., Maquire, H.C.:

Allergic contact dermatitis in the B-cell deficient chicken

Int. Arch. Allergy 50, 755-758 (1976)

Wick, G.:

Theoretische Grundlagen der B- und T-Zellinteraktion

Der Krankenhausarzt 52, 10-24 (1979)

Wishler, R., Stobo, J.D.:

Suppression of humoral and delayed hypersensitivity responses by distinct T cell subpopulations

J. Immunol. 121, 539 (1978)

Yoshida, T.O., Andersson, B.:

Evidence for a receptor recognizing Ag complexed immunoglobulin on the surface of activated mouse thymus lymphocytes

Scand. J. Immunol. 1, 401 (1972)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas, seine hilfsbereite und jederzeit gewährte Unterstützung und Förderung und seine äußerst instruktiven Anleitungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Zugleich danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Betonen möchte ich vor allem die freundliche Unterstützung des Labors Lösch. In diesem Rahmen sei vor allem Frau Dr. M. Scheu für die vorbildliche Einarbeitung und Betreuung und Frau Dr. H. Fiedler für ihre Hilfe und Anleitung gedankt.

Meinen Dank aussprechen möchte ich auch Frau E. Zappe für die hilfreiche Unterstützung.

Zudem möchte ich Frau R. Schropp meine Dankbarkeit ausdrücken für die freundschaftliche Hilfe bei der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

14.10.1952 geboren in Kronach als Tochter des Amtsrats
Otto Schütz und seiner Ehefrau Annemarie,
geb. Wagner

1959-1963 Besuch der Volksschule in Kronach

1963-1972 Besuch des Kaspar-Zeuß-Gymnasiums in Kronach

1972 Abitur

1972-1978 Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität München

25.09.1978 Staatsexamen

1979 Heirat mit Sebastian Schindele

Zur Anfertigung der vorliegenden Dissertation arbeitete ich
von Nov. 1978 bis Mai 1980 am Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fach-
bereich Tiermedizin der Universität München.

